

**Charakterisierung der Beiträge der Transkriptionsfaktoren
STAT3 und c-Jun zur Expressionskontrolle der
malignitätsrelevanten Matrixmetalloproteinase MMP-1**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Josephine Gasch
geboren am 29. Dezember 1987 in Suhl**

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Karl-Heinz Friedrich, Jena**
- 2. Prof. Dr. Aria Baniahmad, Jena**
- 3. Prof. Dr. Fred Schaper, Magdeburg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.11.2013

für

Ingeborg Weiß

Abkürzungsverzeichnis

5- FU	5- Fluorouracil
ABCD	Avidin Biotin Complex DNA
Abb.	Abbildung
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
apc	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APRF	<i>Acute Phase Response Factor</i>
APRG	<i>Acute Phase Response Gene</i>
AS	Aminosäuren
ATF	<i>Activated Transcription Factor</i>
BE	Bindungseinheit
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bZIP	<i>Basic Region Leucine Zipper</i>
bzw.	beziehungsweise
c-Fos	AP-1-Untereinheit
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIS-1	<i>Cytokine Inducible SH2-domain Containing Protein</i>
c-Jun	AP-1-Untereinheit
CRE	<i>cAMP Response Elements</i>
CRC	kolorektales Karzinom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinasen</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis Coli
FKS	fetales Kälberserum
GAS	<i>γ- activated sequence</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>

GRE	<i>Glucocorticoid Response Element</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-Ethansulfonsäure
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRE	<i>IL6 Response Elements</i>
JAK	Januskinase
JDP	<i>Jun Dimerization Protein</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
JunB	AP-1-Untereinheit
JunC	AP-1-Untereinheit
kb	Kilobasen
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
Maf	Makrophagen-Aktivierungsfaktor
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-(4-Morpholino)propansulfonsäure
NP-40	Nonylphenoethoxylat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PIAS	<i>Protein Inhibitor of Activated STAT</i>
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
pSTAT	phosphorylierte, aktivierte Form von STAT
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Zellkulturmedium
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SH2	<i>Src Homology</i> (Domäne)
siRNA	<i>small interfering-RNA</i>
Src	intrazelluläre Tyrosinkinase
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris/ Acetat/ EDTA
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>

TCF	<i>Ternary Complex Factors</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TH- Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	Tetradecanoyl-Phorbolacetat
TRE	<i>TPA Response Elements</i>
TRIS	<i>Tris</i> (hydroxymethyl)-aminomethan
UE	Untereinheiten
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Das kolorektale Karzinom	3
2.2	STAT-Proteine, Komponenten onkogener Signaltransduktion	8
2.3	AP-1-Proteine, Transkriptionsfaktoren mit onkologischer Relevanz	12
2.4	Matrixmetalloproteinasen	17
3	Ziele der Arbeit.....	20
4	Material und Methoden	21
4.1	Material	21
4.1.1	Bakterienstämme und Medien	21
4.1.2	Zelllinien und Medien	21
4.1.3	Cytokine	21
4.1.4	Plasmide	22
4.1.5	Primer für PCR	22
4.1.6	Oligonucleotide für Bindungsassay	22
4.1.7	Antikörper	23
4.1.8	DNA-Größenstandard	23
4.1.9	Proteingrößenstandard	24
4.1.10	Chemikalien und Feinchemikalien	24
4.1.11	Geräte und Zubehör	26
4.2	Molekularbiologische Methoden	27
4.2.1	Herstellung chemokompetenter E.coli-Zellen	27
4.2.2	Transformation kompetenter E.coli-Zellen	27
4.2.3	Gießen von Agarplatten	27
4.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli-Zellen	28
4.2.5	Bestimmung der DNA-Konzentration	28
4.2.6	DNA-Gelelektrophorese	28
4.2.7	ABCD	29
4.2.8	Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)	31
4.3	Zellbiologische Methoden	34
4.3.1	Kultivierung und Passagierung von Säugetierzellen	34

4.3.2	Inkulturnahme und Kryokonservierung von humanen Zellen	34
4.3.3	Bestimmung der Zellzahl einer Kultur	34
4.3.4	Stimulierung von Zellen	35
4.3.5	Transiente Transfektion von HT-29 Zellen.....	35
4.3.6	Dual-Luciferase-Reportergen-Assay	36
4.3.7	Durchflusscytometrie	37
4.4	Proteinbiochemische Methoden.....	38
4.4.1	Zelllyse	38
4.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	38
4.4.3	SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
4.4.4	Western Blot.....	39
4.4.5	Immunodetektion	40
4.4.6	Entfernung gebundener Antikörper von der Blotmembran (Strippen der Membran)	40
5	Ergebnisse	41
5.1	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Bindung von STAT3 und AP-1 an Bindungselemente in artifiziellen MMP-1-Promotorkonstrukten.....	41
5.1.1	Voruntersuchungen zum <i>in vitro</i> Protein-DNA-Bindungsassay	41
5.1.2	Analyse der Bindung von STAT3 an STAT3-Bindungselemente des MMP-1-Promotors	43
5.1.3	Analyse der Bindungsverhältnisse von STAT3 und AP-1 an Bindestellen im MMP-1-Promotor	46
5.2	<i>In vivo</i> Untersuchung zur Bindung von STAT3 und AP-1 an MMP-1 Promotorfragmente	47
5.2.1	Voruntersuchung zur Chromatin-Immunopräzipitation.....	47
5.2.2	Analyse der Bindung von STAT3 und AP-1 an native DNA.....	47
5.3	Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität des MMP-1-Promotors in Reportergenkonstrukten.....	49
5.3.1	Voruntersuchungen zur transienten Transfektion von HT-29-Zellen mit Reportergenkonstrukten	49
5.3.2	Untersuchung der transkriptionellen Aktivität eines Minimalfragments des MMP-1-Promotors „0,6kb“ durch STAT3 und AP-1	53
5.3.3	Untersuchung der transkriptionellen Aktivität eines Minimalfragments „0,6kb“ durch STAT3 und AP-1 nach spezifischem Ausschalten individueller Bindungsstellen	54
5.3.4	Untersuchung der transkriptionellen Aktivität eines Minimalfragments „0,6 kb“ durch IFN	55
6	Diskussion	58
6.1	Interaktion von STAT3 mit dem MMP-1-Promotor	58
6.2	STAT3-c-Jun-Interaktion und transkriptionelle Aktivierung an der STAT3-AP1- Bindungsstelle	59

6.3	STAT1 als möglicher Substituent für STAT3 in der Interaktion mit c-Jun	62
6.4	Ausblick.....	63
7	Anhang.....	65
7.1	Plasmidkarten.....	65
7.2	DNA-Sequenzen des humanen MMP-1-Promotors	67
7.3	Abbildungsverzeichnis	69
7.4	Literaturverzeichnis	70
7.5	Lebenslauf	79
7.6	Danksagung	82
7.7	Selbstständigkeitserklärung	83

1 Zusammenfassung

STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) und der Transkriptionsfaktor AP-1 (*Activated Protein 1*) steuern durch die Übertragung verschiedener Cytokin- und Wachstumsfaktorsignale von der Zellmembran in den Nukleus grundlegende zellphysiologische Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben und Apoptose. Die Aktivierung von STATs und AP-1 ist ein transients und streng regulierter Signaltransduktionsprozess, dessen Dysregulation eine Rolle bei der Krebsentstehung spielt. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind als Zink-abhängige Endopeptidasen ebenfalls in der Karzinogenese am Metastasierungsgeschehen durch den Abbau verschiedener Bindegewebsanteile beteiligt.

Durch Invasions- und Reporterassays konnte bereits früher eine Koinzidenz zwischen der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 und einer erhöhten Expression des Genes für MMPs in Kolorektalkarzinom-Zellen nachgewiesen werden. *In vitro* DNA-Protein-Bindungsassays EMSA zeigen eine hoch-affine phospho-STAT3-Bindung an eine distale STAT3-Bindungsstelle im MMP-1-Promotor. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Bindungseigenschaften der Transkriptionsfaktoren STAT3 und AP-1 an potentielle Erkennungssequenzen im MMP-1-Promotor untersucht. Als Modellsystem diente die Kolorektalkarzinom-Zelllinie HT-29, in der die Transkriptionsfaktoren individuell oder in Kombination durch die Stimuli IL-6 bzw. dem Phorbolester TPA aktiviert wurden.

Zunächst konnte durch *in vitro* DNA-Protein-Bindungsassays ABCD nachgewiesen werden, dass sich der durch IL-6 aktivierte Transkriptionsfaktor STAT3 an jede der sechs potentiellen STAT3-Bindungsstellen auf dem MMP-1-Promotor anlagern kann.

Zusätzliche Experimente wurden speziell für die dem Transkriptionsstart nächstgelegene STAT3-Bindungsstelle „MMP-1D“ durchgeführt, da hier eine AP-1-Bindungsstelle in direkter Nachbarschaft zur STAT3-Bindungsstelle liegt. *In vivo* Chromatinimmunpräzipitationen dokumentierten, dass sowohl phospho-STAT3 an die STAT3-Bindungsstelle als auch c-Jun als Untereinheit von AP-1 an die AP-1-Bindungsstelle binden kann.

Bereits zuvor und auch im Rahmen dieser Arbeit verifiziert wurde außerdem nachgewiesen, dass sich durch TPA aktiviertes AP-1 ebenfalls an die isoliert vorliegende STAT3-Bindungsstelle anlagern kann, genauso wie phospho-STAT3 an die isoliert vorliegende AP-1-Bindungsstelle bindet. Diese Ergebnisse sprechen für eine Bindung der Transkriptionsfaktoren als Komplex („AP1:STAT3“).

Anschließend wurde der Einfluss der Bindung von phospho-STAT3 und AP-1 auf die transkriptionelle Aktivierung der isolierten DNA-Sequenz mit „MMP-1D“- und AP-1-Bindungsstelle des MMP-1-Promotors untersucht. Die durchgeführten Reporterassays zeigten, dass bei einer dualen Stimulation mit IL-6 und dem Phorbolester TPA eine maximale transkriptionelle Aktivierung erreicht

werden kann. Wurden IL-6 oder TPA einzeln eingesetzt, erfolgte eine wesentlich schwächere Stimulation. Diese Ergebnisse erhärten die These, dass eine Bindung als Komplex STAT3:AP1 stattfindet und so eine maximale Induktion der nachgeschalteten Gene impliziert werden kann. Wurde eine der beiden Bindungsstellen mutiert, resultierte daraus eine geringere transkriptionelle Induktion. Dabei fiel auf, dass sich eine Mutation der AP-1-Bindungsstelle erheblich mehr auf die Stimulierbarkeit auswirkt als eine Ausschaltung der STAT3-Bindungsstelle. Daher scheinen die Komplexe, bestehend aus STAT3 und AP-1, zum größten Teil über die Bindung an die AP-1-Bindungsstelle eine Transkriptionsaktivität auszulösen. Die STAT3-Bindungsstelle ist in diesem Fall von sekundärer Bedeutung.

Zusätzlich wurden Reporterassays nach Aktivierung von STAT1 durchgeführt. STAT1 besitzt eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit STAT3, agiert in der Karzinogenese aber eher antiproliferativ. Durch IFN γ -Stimulation aktiviertes STAT1 wirkte sich kaum auf die transkriptionelle Induktion aus. Wurde IFN γ allerdings gemeinsam mit dem c-Jun aktivierenden TPA eingesetzt, war eine erhöhte transkriptionelle Stimulation nachweisbar. Lag die AP-1-Bindungsstelle mutiert vor, sank die transkriptionelle Aktivierung trotz dualer Stimulation, während die erhöhte Induktion der Transkription bei mutierter STAT3-Bindungsstelle und Stimulation mit IFN γ und TPA weiterhin bestehen blieb. Eine mögliche Interpretation dieser Befunde ist, dass STAT1 in diesem Fall STAT3 substituiert und sich der Komplex STAT1:AP1 an die AP-1-Bindungsstelle anlagern kann.

Zusammenfassend konnten im Rahmen dieser Dissertation Hinweise darauf geliefert werden, dass STAT3 und AP-1 sich als Komplex vor allem über die AP-1-Bindungsstelle an den MMP-1-Promotor anlagern und eine transkriptionelle Aktivität hervorrufen können. Bei STAT3-Abwesenheit scheint STAT1 STAT3 substituieren zu können und interagiert im Komplex mit AP-1 mit dem MMP-1-Promotor.

2 Einleitung

2.1 Das kolorektale Karzinom

Die Krebserkrankung ist eines der häufigsten Krankheitsbilder der heutigen Gesellschaft. Der Begriff „kolorektales Karzinom“ umfasst Krebserkrankungen im Bereich des Dickdarms, Mastdarms und Rektums, welche mehr als 95% der bösartigen Darmkrebstumore ausmachen. Meist handelt es sich um Adenokarzinome, die sich aus den Drüsen der Darmschleimhaut ableiten. Die einzelnen Darmabschnitte sind nicht gleichmäßig betroffen: Während 60% der Karzinome im Colon descendens, dem linken absteigenden Anteil des Dickdarms, im Sigma und im Rektum diagnostiziert werden, befinden sich 25% im Caecum, dem Übergangsbereich zwischen Dünn- und Dickdarm. Nur 15% entstehen im Colon ascendens, dem rechten aufsteigenden Anteil des Dickdarms (Robert Koch Institut, 2008).

Epidemiologie und Demographie

Darmkrebs ist sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung. Jährlich gibt es über 37.000 Neuerkrankungen bei Männern und über 36.000 bei Frauen. Statistisch erkranken mehr als 6% der Deutschen im Laufe ihres Lebens an dieser Karzinomart. Das Durchschnittsalter bei der Diagnose liegt bei 69 bzw. 75 Jahren. Circa 90% der kolorektalen Karzinome werden nach dem 50. Lebensjahr diagnostiziert. So gilt diese Krebsform bis heute als Alterskrankheit, Ausnahmen bilden hier erblich- und entzündungsbedingte Krankheiten, die zum Auftreten von Darmkrebs führen (Robert Koch Institut, 2008).

Ätiologie

Die Risikofaktoren für kolorektalen Krebs sind sehr vielfältig. Zu den selbst beeinflussbaren Faktoren zählen neben Übergewicht und Bewegungsmangel vor allem ernährungsbedingte Faktoren wie allgemein ballaststoffarme und fettreiche Ernährung mit hohem Anteil an rotem (eisenhaltigem) Fleisch und wenig Gemüse, sowie regelmäßiger Alkoholkonsum. Dies sind gleichzeitig auch Gründe für die weltweit differente Inzidenz: In Industrieländern treten aufgrund des Lebensstils kolorektale Karzinome wesentlich häufiger auf als in Entwicklungsländern.

Als Risikofaktor wird ebenfalls die Verwandtschaft ersten Grades zu einem Verwandten mit Darmkrebs aufgeführt. Dabei ist allerdings bisher nicht klar, ob diese Tatsache auf einem ähnlichen Lebensstil beruht (Robert Koch Institut, 2008).

Neben den selbst verursachten Risikofaktoren spielen auch Primärerkrankungen eine Rolle. So werden beispielsweise unter anderem das Gardner-Syndrom, das Turcot-Syndrom, das Peutz-Jeghers-Syndrom, familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das erbliche nicht-polypöse

kolorektale Krebsyndrom (HNPCC) zu den obligaten Präkanzerosen gezählt, bei denen wiederum die Wahrscheinlichkeit des Ausbruchs von Krebs vor allem in frühen Lebensjahren hoch ist. Exemplarisch aufgeführt liegt bei der FAP eine Mutation des Tumorsuppressorgens *apc* (*adenomatous polyposis coli Protein*) auf Chromosom 5 vor, wodurch Zellwachstum und Telomerasenbildung gefördert werden. Dieser Defekt im Genom führt unbehandelt in jedem Fall zu Darmkrebs. Ebenfalls kanzerogen können chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa wirken (Rustgi, 2007; Möslein, 2008).

Nach neueren Forschungsergebnissen begünstigt auch mit Insulin behandelter Diabetes mellitus Typ II die Darmkrebsentstehung, da Insulin wachstumsfördernde Eigenschaften besitzt und so zusätzlich auch an der Rezidivbildung beteiligt sein kann (Schiel *et al.*, 2005).

Pathogenese

Der Pathogenese kolorektaler Karzinome liegt meist die sogenannten Adenom-Karzinom-Sequenz (Vogelstein *et al.*, 1988; Robbins und Itzkowitz, 2002) zugrunde. Sie beschreibt das schrittweise Entstehen kolorektaler Karzinome aus normaler Darmschleimhaut. Es werden genetische Veränderungen in einer regelhaften Abfolge beobachtet, welche sich direkt mit histologisch morphologischen Korrelaten des Kolorektums verknüpfen lassen.

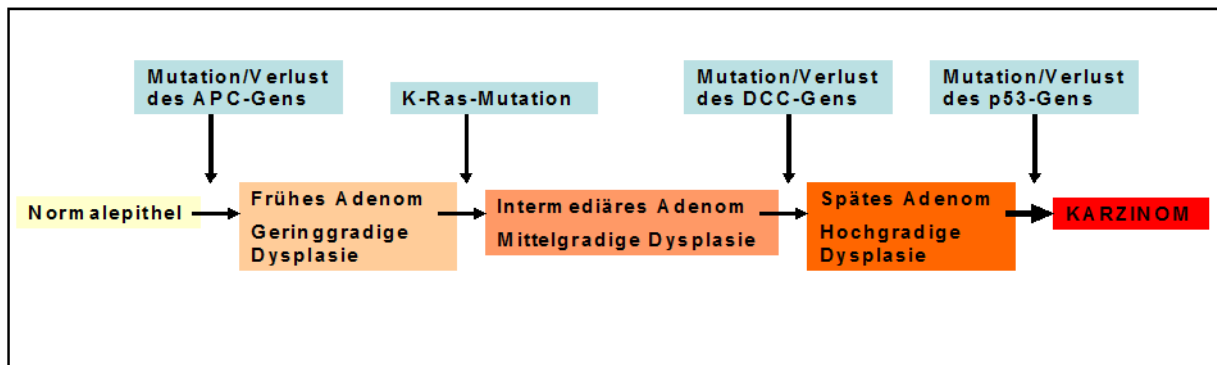


Abb. 1: Adenom-Karzinom-Sequenz (modifiziert nach Robbins und Itzkowitz, 2002)

Aus Normalgewebe entwickelt sich durch eine Mutation im *apc*-Gen dysplastisch verändertes Darmschleimhautgewebe. Durch weitere Mutationen kann es zur Ausprägung eines adenomatösen Kolonpolypen (Adenom) kommen. Bei weiteren Veränderungen an einflussreichen Genen, wie zum Beispiel dem Tumorsuppressorgen *p53*, kann der Polyp karzinomatös entarten und die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen.

Die Dysplasie nimmt in diesem Modell eine Mittelstellung zwischen normaler Schleimhaut und invasivem Karzinom ein, wobei ein stufenweiser Übergang von gesunder Schleimhaut über eine geringgradige (*low grade*) zu einer hochgradigen (*high grade*) Dysplasie beobachtet wird (Köhne, 2001; Narayan und Roy, 2003).

Für die Entstehung kolorektaler Karzinome sind Mutationen in mindestens sechs Genen nötig (Vogelstein *et al.*, 1988). Dabei werden somatische Mutationen zum einen in rezessiven Onkogenen

(z.B. *ras*, *myc*, *src*, *erbB-2*) und zum anderen in dominanten Tumorsuppressorgenen (z.B. *apc*, *mcc*, *dcc*, *p53*) beobachtet (Goyette *et al.*, 1992, Stanbridge, 1990).

Zur Tumorausbildung können zudem chromosomale Deletionen und Methylierungsveränderungen sowie Instabilität von Mikrosatelliten beitragen (Buermeyer *et al.*, 1999).

Metastasierung

Die Ausbreitung bzw. Metastasierung von Kolorektalkarzinomen erfolgt frühzeitig in regionale Lymphknoten. Betroffen ist vor allem die Leber. Zusätzlich wird eine hämatogene Metastasierung ausgelöst: Über die Vena cava inferior gelangt das Blut aus betroffenen Gebieten zuerst in die Lunge und über die Pfortader in die Leber, sodass in diesen Organen häufig auch hämatogene Metastasen vorliegen. Die perineurale Invasion bildet den Abschluss des Metastasierungsprozesses im Körper. Der Grad der Metastasierung korreliert mit der Invasionstiefe der Kolonwand (Fujimori *et al.*, 2009).

Angiogenese ist die Voraussetzung für die Proliferation und Metastasierung von Tumoren. Durch den erhöhten Stoffwechsel im karzinogenen Zellverband kommt es durch unzureichende Sauerstoffversorgung zu einer Hypoxie, wodurch die Konzentration von HIF-1 α (*Hypoxia inducible factor*) steigt. Dieser ist in der Lage VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) zu aktivieren: Den Schlüsselmediator für Angiogenese. VEGF bindet an den VEGF-Rezeptor, der beispielsweise auf Endothelzellen exprimiert wird, und regt dadurch die Bildung weiterer Blutgefäße an (Jain *et al.*, 1998).

Weitere Faktoren, die mit Metastasierung in Verbindung gebracht werden, sind Cyclin D1, Cyclooxygenase 2, IL-8, bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) und EGF (*Epidermal Growth Factor*), der die Zellproliferation und Differenzierung fördert, sodass Tumorzellen in der Regel zu den am schnellsten wachsenden Zellen gehören (Huang *et al.*, 2002; Jain *et al.*, 1998). Ebenfalls eine wichtige Rolle spielen Matrixmetalloproteinasen, deren transkriptionelle Expression im Rahmen dieser Arbeit näher beleuchtet wurde.

Diagnostik

Das kolorektale Karzinom ist häufig jahrelang symptomlos. Erst bei starken Blutungen aus dem Tumor, die mit Blut im Stuhl einhergehen, oder starker Beeinträchtigung des Darmlumens, was zu Darmkrämpfen, starker Flatulenz, Verstopfung oder auch Durchfällen führt, wird ein Krankheitsgefühl wahrgenommen. Vielfach führen diese Beschwerden sekundär zu Anämie, was sich bis zur Tumorkachexie steigern kann. Dabei gibt es prophylaktische Untersuchungen, die den Krebs meistens frühzeitig sichtbar machen können: Neben der digital-rektalen Untersuchung weist beispielsweise der HämoCult®-Test verstecktes Blut im Stuhl nach.

Eine endgültige Diagnose liefert oft die Koloskopie, die meistens mit einer Biopsieentnahme verbunden ist, an die sich eine ausführliche histologische Untersuchung anschließt. Zusätzlich können

noch ein Becken-MRT bzw. CT oder eine Sonographie des Abdomens erfolgen (Leitlinien Berlin; Herold *et al.*, Ausgabe 2010)

Therapie

Die Therapie ist abhängig von Lokalisation und Stadium des Tumors. Prinzipiell gibt es verschiedene Möglichkeiten, die häufig noch miteinander kombiniert werden.

Die sicherlich drastischste Maßnahme ist die vollständige operative Resektion des tumortragenden Darmabschnittes und des dazugehörigen Lymphabflussgebietes (Leitlinien Berlin). Meist steht damit die zweite Möglichkeit in Verbindung: Chemo- und Radiotherapien. Hier gibt es, abhängig vom Therapieziel, verschiedene Formen, beispielsweise neoadjuvante, adjuvante und palliative Therapien. Ein häufig verwendetes Zytostatikum ist 5-Fluorouracil (5-FU), ein Pyrimidinanalogon, welches die Thymidylatsynthase hemmt, wodurch der Folsäurestoffwechsel und damit die gesamte DNA-Synthese gehemmt wird. Im sogenannten FOLFOX-Schema wird neben Folsäure (zur Anregung des Stoffwechsels) und 5-FU zusätzlich noch Oxaliplatin verabreicht. Diese Substanz verhindert, wie auch Cisplatin und Carboplatin, ein Auseinanderweichen der DNA-Stränge bei Replikation und Transkription. Im Folfiri-Schema wird neben Folsäure und 5-FU zusätzlich Irinotecan gegeben. Dabei handelt es sich um einen Topoisomerase-Hemmer, der ebenfalls ein Auseinanderweichen der DNA-Stränge erschwert und so Replikation und Transkription weitestgehend verhindert. Zytostatika greifen also in die Proteinbiosynthese ein (Arnold *et al.*, 2008; Aktories *et al.*, Ausgabe 2010).

Neuere Therapiemethoden zielen auf die zelluläre Kommunikation und Signaltransduktion ab. Zu den komplexen Kommunikationsmechanismen zählen beispielsweise die Signalkaskaden von klassischen Hormonen, Gewebshormonen und Cytokinen. Cytokine sind Glykoproteine, zu denen Interleukine (IL), Interferone (IFN), koloniestimulierende Faktoren (CSF), Tumornekrosefaktoren (TNF) und Chemokine gehören. Sie können *autokrin* (die Zelle stimuliert sich selbst), *parakrin* (eine Zelle stimuliert ihre benachbarten Zellen) und *endokrin* (ein Cytokin wirkt auf den gesamten Organismus) wirken. An den ausgelösten intrazellulären Prozessen sind oft eine Vielzahl von Enzymen und sekundären Botenstoffen (Second Messenger) beteiligt (Arai *et al.*, 1990; Nicola, 1994; Heinrich *et al.*, 1998).

Die koordinierte Funktion intrazellulärer signalvermittelnder Proteine ist letztendlich Voraussetzung für ein physiologisches Verhalten der Zellen im Organismus. Grundlage bilden meist Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Inzwischen gibt es eine Reihe von therapeutisch eingesetzten monoklonalen Antikörpern, die häufig als Rezeptorblocker fungieren.

So wirken die monoklonalen Antikörper Panitumumab und Cetuximab als Antagonisten zum Rezeptor für den Wachstumsfaktor EGF (*Epidermal Growth Factor*), der auf Membranen menschlicher Körperzellen vorhanden ist und in besonders hohen Konzentrationen in Krebszellen

auftritt. Beim Darmkrebs ist EGFR bei 80% der Zellen überexprimiert. Durch Bindung des Antikörpers an diesen Rezeptor wird dessen Aktivierung und die nachgeschaltete Signaltransduktion gehemmt. Dadurch vermehrt sich die Zelle nicht mehr und die Metastasierung wird vermindert. Zudem scheint Cetuximab die Fähigkeit der Tumorzellen zu hemmen, durch Chemo- und Strahlentherapie verursachte Schäden zu reparieren. Außerdem wird vermutet, dass es die Ausbildung neuer Blutgefäße in Tumoren verringert, was dem Tumorwachstum entgegen wirkt. Ein weiterer Vorteil sind die niedrig gehaltenen Nebenwirkungen (Aktories *et al.*, Ausgabe 2010).

Bevacizumab hingegen bindet an den Rezeptor des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGFR), der an der Angiogenese beteiligt ist. Durch diese Blockade können sich weniger neue Blutgefäße bilden, wodurch wiederum die Nährstoffversorgung des Tumors gemindert und damit die Invasion in benachbartes Gewebe behindert wird (Jain *et al.*, 1998).

Prognose

Die Überlebensaussichten ehemaliger Erkrankter entsprechen fünf Jahre nach Diagnose und anschließender Behandlung denen der allgemeinen Bevölkerung. Diagnose- und Therapiemöglichkeiten wurden immer weiter entwickelt, sodass sich die Überlebensaussichten in den letzten Jahrzehnten nachhaltig verbessert haben. Die 5-Jahre-Überlebensrate liegt mittlerweile sowohl bei Frauen als auch bei Männern bei 60%. (Robert Koch Institut, 2008)

Dennoch ist der Früherkennungseffekt aufgrund mangelnder Bereitschaft zu prophylaktischen Untersuchungen immer noch sehr gering und je fortgeschrittener die Krankheit ist, desto geringer sind die Überlebenschancen (Robert Koch Institut, 2008; Karow und Lang, Ausgabe 2010)

Obwohl bereits große Fortschritte bei der Aufklärung molekularer Mechanismen während der Karzinogenese kolorektaler Tumoren und deren Therapie gemacht wurden, bleiben viele Fragen offen. Die Entstehungsmechanismen des kolorektalen Karzinoms sind offenbar sehr heterogen. Es gibt eine Vielzahl alternativer oder zusätzlicher molekularer Wege, die zur Karzinomentstehung beitragen. Die Dysregulation bestimmter Signaltransduktionswege, beispielsweise durch Stress, führt zu Veränderungen der genregulatorischen Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Dazu zählen der JAK-STAT-Signalweg und der MAP-Kinase-Signalweg, wobei fehlgeleitete Transduktionsprozesse dieser beiden Wege bereits in zahlreichen Karzinomen nachgewiesen wurden (Narayan und Roy, 2003).

Als Teile dieser Signalwege beeinflussen unter anderem STAT-Proteine und AP-1 die Invasivität und Metastasierung kolorektaler Karzinome. Bereits 2005 konnte eine Korrelation zwischen hyperaktivem STAT3 und AP-1 in Biopsiematerial nachgewiesen werden. Außerdem ist bekannt, dass sowohl STAT3 als auch AP-1 eine wichtige Rolle bei der Expression der Matrixmetalloproteinasen, deren Beitrag als körpereigene Protease zur Malignität ebenfalls bereits bekannt ist, spielen. (Corvinus *et al.*, 2005; Tsareva *et al.*, 2007).

2.2 STAT-Proteine, Komponenten onkogener Signaltransduktion

Molekularer Aufbau der STAT-Proteine

Die ersten STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) wurden zu Beginn der neunziger Jahre im Zusammenhang mit Interferon-vermittelter Genaktivierung als DNA-bindende Proteine entdeckt (Darnell *et al.*, 1997; Bromberg, 2001). STAT-Proteine kontrollieren als Transkriptionsfaktoren eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Proliferation und Differenzierung. Mittlerweile umfasst die STAT-Familie bei Säugern sieben verschiedene Mitglieder (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6), die eine Länge zwischen 780 und 800 Aminosäuren aufweisen. Die STAT-Proteine lassen sich in fünf strukturelle und funktionelle Domänen aufteilen, schematisch dargestellt in Abbildung 2.

Die aminoterminalen Aminosäuren vermitteln die Dimer-Dimer-Interaktion zur Bildung von tetrameren STAT-Molekülen, die in Hakenform angeordnet sind. Die Tetramerisierung bewirkt eine stabilere STAT-DNA-Bindung an schwachen Promotoren. Außerdem reguliert diese Domäne die Kerntranslokation (Vinkemeier *et al.*, 1996; Kisseleva *et al.*, 2002; O'Shea *et al.*, 2002). Die benachbarte Coiled-Coil-Domäne ermöglicht Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen wie NF- κ B, SMADs, Sp1, USF1 und c-Jun (Bromberg *et al.*, 2000; Darnell *et al.*, 1997; O'Shea *et al.*, 2002). Die sich anschließende DNA-Bindungsdomäne bestimmt die DNA-Bindungsspezifität der individuellen STATs (Chen *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1998). Für die Verbindung der DNA-Bindungs- und SH2-Domäne (*Src-Homology Domain* 2) ist die so genannte Linkerdomäne verantwortlich, die ebenfalls an der DNA-Bindung beteiligt ist. Die hoch konservierte SH2-Domäne vermittelt sowohl die spezifische Interaktion mit dem phosphorylierten Rezeptor als auch die Dimerisierung zwischen phosphorylierten STAT-Monomeren (Heim *et al.*, 1995). Am C-Terminus des Moleküls befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAD), die für die Kommunikation mit dem Transkriptionsapparat zuständig ist. Sie beinhaltet eine potentiell phosphorylierbare Serin- und eine Tyrosin-Bindungsstelle. Kommt es zu diesen Phosphorylierungen, steigt die Transkriptionsaktivität, was in der Expressionsförderung resultiert.

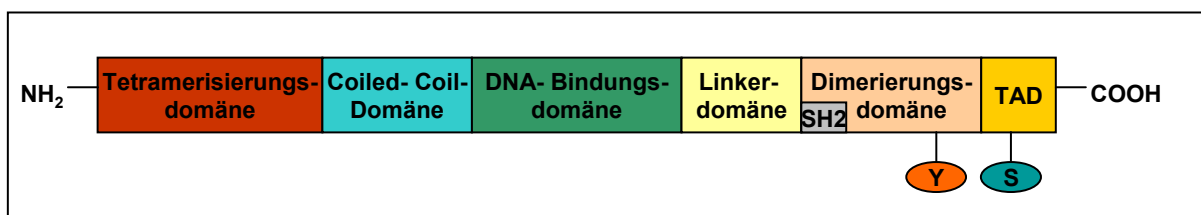


Abb. 2: Die Domänenstruktur der STAT-Proteine

TAD= Transaktivierungsdomäne

Details siehe Text

Zusätzlich sorgt die Phosphorylierung für die Regulation und den Crosstalk („Nebensignaleffekte“) durch verschiedene Rezeptoren. Diese Domäne variiert in der Länge sowie in der Sequenz bei den einzelnen STAT-Mitgliedern (O’Shea *et al.*, 2002; Schindler *et al.*, 2002).

Der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg

STAT-Proteine liegen latent im Zytoplasma oder an der Zellmembran anliegend in hypophosphorylierter Form vor; zum Teil sind sie auch mit Rezeptoren präassoziiert (Leaman *et al.*, 1996). Extrazelluläre Liganden rufen die Aktivierung der STAT-Moleküle hervor. Bisher sind mehr als 40 verschiedene Liganden bekannt, die unterschiedliche Mechanismen zur Aktivierung von STAT-Proteinen nutzen (Bromberg, 2001).

Dabei kommt es durch Anlagerung von Liganden an ihren Rezeptor, beispielsweise an die gp130-Untereinheit des IL-6-Rezeptors, zur Dimerisierung der Rezeptoreinzelketten. Bei den im zytoplasmatischen Teil der Rezeptoren assoziierten Januskinasen (JAK) führt dies zur Autophosphorylierung und zur Phosphorylierung der Rezeptortyrosinreste (Guschin *et al.*, 1995; Gadina *et al.*, 2001). Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstelle für inaktive STAT-Proteine, wodurch diese wiederum in unmittelbare Nähe der JAKs gelangen und an einem spezifischen Tyrosinrest am Carboxylende phosphoryliert werden. Die nun phosphorylierten STATs lösen sich vom Rezeptor und können anschließend über reziproke SH2-Phosphotyrosin-Interaktion Homo- bzw. Heterodimere bilden (Bromberg *et al.*, 2001). Damit sind alle Voraussetzungen geschaffen, um in den Zellkern transloziert zu werden. Verantwortlich für den Import in den Nukleus sind unter anderem Nuklear-Import-Rezeptoren und das Protein Importin- α 5 (O’Shea *et al.*, 2002). Im Zellkern binden die STATs an ein generelles DNA-Motiv: TTNCNNAA- die GAS (γ -activated-sequence). Dabei bildet das phosphorylierte STAT-Dimer mit Hilfe der SH2-Domänen eine „Nussknacker-Struktur“ um die DNA (Horvath *et al.*, 1995; O’Shea *et al.*, 2002).

Zusätzlich zu den Januskinasen können auch Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (EGF- und PDGF-Rezeptor) direkt STAT-Proteine phosphorylieren (Bowman *et al.*, 2001). Eine Rezeptor-unabhängige STAT-Phosphorylierung erfolgt zum Beispiel durch die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen Abl und Src (Garcia *et al.*, 2001).

Regulation der STAT-Proteine

Dauer und Intensität der STAT-Aktivierung werden durch verschiedene Prozesse reguliert. So beenden nukleäre Phosphatasen über eine direkte Dephosphorylierung die STAT-Aktivität (Aoki *et al.*, 2002; ten Hoeve *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.*, 2000), aber auch Ubiquitylierungs- und Degradierungsprozesse durch Proteasomen (Hoey *et al.*, 1998), sowie Inaktivierung von Zytokinrezeptoren oder JAKs durch Tyrosinphosphatasen, wie SHP-1, SHP-2 oder CD45 (Irie-Sasaki *et al.*, 2001), können die STAT-Aktivität modulieren.

STATs können zudem selbst - im Sinne eines negativen Feedbacks - Proteine aktivieren, welche als negative STAT-Regulatoren fungieren. Dies sind zum Beispiel CIS-1 (*Cytokine Inducible SH2-domain Containing Protein*) oder SOCS1, 2 und 3 (*Suppressor Of Cytokine Signaling*) (Terabe *et al.*, 2000; Yasukawa *et al.*, 2000), die indirekt durch Blockade der Zytokinrezeptor-Phosphorylierung, Inhibition der JAKs oder Förderung von deren Ubiquitinylierung, in der Lage sind die STAT-Aktivität zu unterbrechen.

Eine direkte und spezifische Inhibition der STAT-DNA-Interaktion kann durch PIAS (*Protein Inhibitor of Activated STAT*) erfolgen (Chung *et al.*, 1997). Außerdem besteht die Möglichkeit der Inhibition und Modulation durch natürliche Splicevarianten der STATs (Ward *et al.*, 2000), sowie Modulation der Transkriptionsaktivität durch zusätzliche Serinphosphorylierung (Wen *et al.*, 1995; Jain *et al.*, 1998).

Physiologische Bedeutung der STATs

Die physiologischen Aufgaben der STAT-Transkriptionsfaktoren sind sehr vielseitig. Sie regeln essentielle Prozesse bei der Embryogenese und der Immunantwort. Sie kontrollieren Differenzierung, Entwicklung, Regeneration, Proliferation und Apoptose von Zellen (Bowman *et al.*, 2000). Die wichtigsten Funktionen der einzelnen STAT-Proteine zeigten sich nach genetischer Depletion in Knockout-Mäusen.

So konnte gezeigt werden, dass STAT1-defiziente Mäuse durch eine defekte zelluläre Antwort auf IFN γ -Stimulation für virale und bakterielle Infektionen anfällig werden (Meraz *et al.*, 1996; Durbin *et al.*, 1996). Außerdem hat STAT1 Einfluss auf antiproliferative und proapoptotische Effekte. Dadurch lässt sich auch die verstärkte Tumorbildung *in vivo* erklären, wenn STAT1-Proteine fehlen (Thomas *et al.*, 2004).

STAT4 (beispielsweise aktiviert durch IL-12) beeinflusst u.a. die TH1-Differenzierung und trägt damit zur Bekämpfung intrazellulärer Pathogene, Tumore und Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, bei (O'Shea *et al.*, 2002).

STAT5A und 5B sind in der Aminosäuresequenz zu 96% identisch und werden durch eine Vielzahl von Cytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert. Die wichtigste Funktion von STAT5 liegt in der Regulation der Zellteilung, der Apoptose und der Zellzyklusproliferation. Während STAT5A in der Prolactin-vermittelten Brustdrüsenentwicklung eine Rolle spielt, ist STAT5B unter anderem an der geschlechtsspezifischen Organogenese beteiligt (Liu *et al.*, 1997; Ihle, 2001; O'Shea *et al.*, 2002; Moriggl *et al.*, 2005).

STAT6 (beispielsweise aktiviert durch IL-4 und IL-13) ist an der TH2-Differenzierung beteiligt. STAT6-defiziente Mäuse haben einen Defekt in der Antikörper-vermittelten Immunantwort (Kaplan *et al.*, 1996).

STAT3 wird in einem eigenen Kapitel detailliert behandelt.

STAT3- ein Transkriptionsfaktor mit onkogenen Eigenschaften

STAT3 wurde 1994 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen als *Acute Phase Response Factor* (APRF) beschrieben, der in Leberzellen die Transkription der Akute-Phase-Proteinen einleitet (Lütticken *et al.*, 1994; Akira *et al.*, 1994). Unabhängig davon klonierten Zhong *et al.* diesen Transkriptionsfaktor, welcher ubiquitär in allen Geweben auftritt und gaben ihm den Namen STAT3 (Duncan *et al.*, 1997; Zhong *et al.* 1994).

Die wichtigsten Funktionen der STATs offenbarten sich nach Depletion ihrer Gene in *Knockout*-Mäusen, wobei STAT3 das einzige Protein der STAT-Familie ist, dessen *Knockout*-Mäuse nicht lebensfähig sind. Das bewies, dass STAT3 essentielle Funktionen in frühen Entwicklungsphasen der Embryogenese hat. So konnte zum einen gezeigt werden, dass ein STAT3-*Knockout* in embryonalen Mausanlagen bereits vor der Gastrulation zum Absterben führt (Darnell, 1997). Zum anderen sind ausgereifte STAT3-defiziente Zellen, wie Darmepithelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten aber lebensfähig und weisen nur wenige Defekte auf.

Auch in humanen Trophoblasten konnte aktiviertes STAT3 gefunden werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass STAT3 während der Entwicklung und für die Funktion der Plazenta eine Rolle spielt (Corvinus *et al.*, 2005).

STAT3 wird nicht nur eine antiapoptotische Wirkung zugeschrieben, sondern es scheint ebenfalls wesentliche wachstums- und Zelldifferenzierungsfördernde Eigenschaften in Tumorzellen zu besitzen (Bromberg, 2001; Levy und Lee, 2002). Dass STAT3 einen Einfluss auf den Zellzyklus besitzt, konnte unter Zellkulturbedingungen gezeigt werden. So erhöht STAT3, wenn es durch Rezeptoren der gp130-Familie aktiviert wird, die Expression von Cyclin D2, D3, A und cdc25A und supprimiert *p21* und *p27*, was zur Progression des Zellzyklus von der G zur S-Phase führt (Fukada *et al.*, 1996).

Dieser Einfluss ist jedoch abhängig vom Gewebetyp und Entwicklungsstadium. Dabei führt STAT3 in der Brustdrüse, wo es normalerweise die Apoptose aktiviert, nach Depletion zu einer Verzögerung der Involution (Chapman *et al.*, 1999). Eine Kontrollfunktion bei der Zellmigration konnte STAT3 bei der Entwicklung des Neuralrohrs im Zebrafischmodell, sowie in Keratinozyten zugeschrieben werden (Sano *et al.*, 2001; Yamashita *et al.*, 2002). In der IL-6-induzierten Akute-Phase-Reaktion ist STAT3 der bestimmende Transkriptionsfaktor bei der Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber (Alonzi *et al.*, 2001; Heinrich *et al.*, 1998). STAT3 kann offenbar auf gegensinnige Art und Weise das Zellwachstum beeinflussen und übt somit gewebeabhängig seine Funktionen aus (Levy und Lee, 2002).

So wird eine veränderte STAT3-Aktivität mittlerweile als funktionell wichtig für die Entstehung und das Überleben von verschiedenen malignen Tumoren betrachtet (Burke *et al.*, 2001). Da durch STAT3 Gene reguliert werden, die sowohl in der Wundheilung wie auch in der Tumorgenese von Bedeutung sind, gibt es Hypothesen, die einen Zusammenhang zwischen der Krebsentstehung auf molekularer

Ebene und einer gestörten Wundheilung postulieren (Dauer *et al.*, 2005). Derzeit liegen keine Erkenntnisse vor, über welche Mechanismen die exzessive STAT3-Aktivität in den Tumoren entsteht. Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass die STAT3-Aktivität in kolorektalen Karzinomen zu einer gesteigerten Proliferation und eine Suppression der STAT3-Aktivität zu einer Reduktion des Tumorwachstums führt (Corvinus *et al.*, 2005).

2.3 AP-1-Proteine, Transkriptionsfaktoren mit onkologischer Relevanz

Molekulare Struktur von AP-1

Die evolutionäre Herkunft des Proteins AP-1 (*Activator Protein 1*) kann bis zu Hefezellen zurückverfolgt werden, in denen es an der transkriptionellen Antwort auf verschiedene Stressreaktionen beteiligt ist. 1987 wurde AP-1 von Angel *et al.* und Lee *et al.* schließlich in Säugerzellen als Transkriptionsfaktor beschrieben, der sowohl TPA (*Tetradecanoyl-Phorbolacetat*)-induziert als auch konstitutiv aktiv die Transkription verschiedenster Gene kontrollieren kann. Daraufhin wurden erste Erkenntnisse hauptsächlich in Mauszellen gewonnen. Mittlerweile sind viele Beobachtungen auch auf humane Zellen übertragen worden, sodass nun von AP-1 als Transkriptionsfaktor gesprochen wird, der als Antwort auf verschiedenste Umwelteinflüsse und Wachstumsfaktorensignale außerordentlich viele Aspekte der Zellphysiologie regulieren kann (Wagner, 2001)

AP-1 umfasst eine Gruppe von strukturell miteinander verwandten Proteinen. Die wichtigsten gehören zur Jun-Familie (c-Jun, Jun-B und Jun-D) und zur Fos-Familie (c-Fos, Fos-B, Fra-1 und Fra-2). Diese Unterfamilien wurden bereits 1983 von van Straaten *et al.* als zelluläre Homologe zu retroviralen Onkoproteinen (v-Jun und v-Fos) entdeckt, konnten damals aber noch nicht eingeordnet werden. Weiterhin zählen zur AP-1-Familie die *Jun Dimerization Proteins* JDP und die *Activated Transcription Factors* ATF (Didieu und Lefebvre, 2006). Aufgrund ihrer Bindungsaktivität zu c-Jun und c-Fos können einige Maf (Makrophagen- Aktivierungsfaktor)- Proteine (v-Maf, c-Maf, Nrl) im weiteren Sinne ebenfalls zu den *Activator Proteins* gezählt werden (Swaroop *et al.*, 1992).

c-Jun als Untereinheit von AP-1 wird schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Prinzipiell besitzen alle Untereinheiten (UE) gleiche strukturelle Domänen: bZIP- *Basic Region Leucine Zipper*. Diese Proteindomäne enthält viele basische Aminosäuren und liegt als Alpha-Helix mit Heptadenmuster (jeder 7. Aminosäurerest ist hydrophob) vor. Kommen die Domänen zweier UE miteinander in Kontakt, lagern sich in hydrophiler Umgebung durch entstehende hydrophobe Wechselwirkungen die basischen Aminosäuren zusammen und die alpha-Helices winden sich zu einer linksgängigen Superhelix (coiled-coil). Es entstehen so Homo- und Heterodimere. Dabei ist die Zusammensetzung

der verschiedenen *Leucine Zipper* in einem Protein verantwortlich für die Spezifität und Stabilität der Dimere. Die Dimer-Bildung ist die Voraussetzung für die volle Funktionalität von AP-1 (van Dam und Castellazzi, 2001; Wagner *et al.*, 2001; Ginsberg *et al.*, 2007).

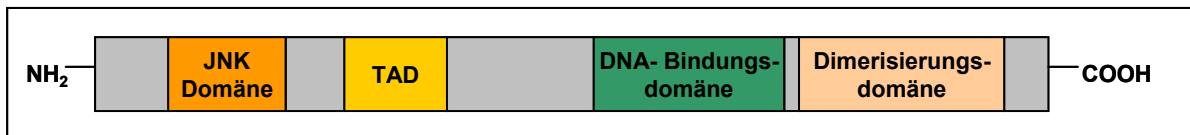


Abb. 3: Die Domänenstruktur von c-Jun (nach Hess *et al.*, 2004)

TAD= Transaktivierungsdomäne

JNK= c-Jun N-terminale Kinasen

Details siehe Text

DNA-Bindung von AP-1

Die DNA-Bindung von AP-1 erfolgt nur, wenn eine Dimer-Bildung stattgefunden hat. Ist eine Superhelix entstanden, kann sich diese an die DNA anlagern. Dabei stehen die Superhelixarme auseinander, eine Gabelform bildet sich. So können die positiv geladenen Aminosäuren an das negativ geladene Phosphatrückgrat der DNA binden. Die Bindung erfolgt prinzipiell an *TPA Response Elements* (TRE): 5'-TGAG/CTCA-3', hier wird die Transkription als Antwort auf den Phorbol-ester TPA induziert (Angel und Karin, 1991; Hess *et al.*, 2004). Im Heterodimer mit c-Jun kann ATF zusätzlich an *cAMP Response Elements* (CRE; 5'-TGACGTCA-3') binden (Shaulian und Karin, 2002).

Der genaue Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung ist bisher noch nicht im Detail verstanden. Allerdings ist beschrieben, dass die Aktivierung durch verschiedene UE unterschiedlich stark ist. So gelten Jun, Fos und Fos-B als besonders starke Aktivatoren, währenddessen Jun-B, Jun-D, Fra-1 und Fra-2 eine eher schwache Aktivierung vermitteln. Unter Umständen können diese sogar als Repressoren der AP-1-Aktivität arbeiten (Hess *et al.*, 2004).

Regulation von AP-1

Die Regulation kann zum einen durch Autokontrolle und zum anderen durch den Einfluss externer Stimuli erfolgen.

Autokontrolle zwischen den AP-1-Untereinheiten

Sobald mehrere AP-1-UE gebildet werden, greift die positiv bzw. negativ regulierende Autokontrolle ineinander. So beeinflussen sich ATF und c-Jun gegenseitig in ihrer Expression, da sie die Bindungsstellen in den Promotoren der jeweils anderen AP-1-UE besetzen und damit deren Proteinbiosynthese inhibieren können. Die Dimere c-Jun:Fos und c-Jun:Fra-1 hingegen können die Expression von Fra-1 und Fra-2 positiv beeinflussen. Diese Feedback-Kontrolle erlaubt eine fein regulierte Konzentration der einzelnen UE über eine längere Zeit in der Zelle.

Einfluss externer Stimuli auf die AP-1-Regulation

Die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation von AP-1 kann durch unterschiedlichste Wege erfolgen. Durch externe Stimulation der Zelle, beispielsweise durch Wachstumsfaktoren, kann unter anderem das Proto-Onkogen Ras (*Rat sarcoma*) über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden. Dies führt zu einer Aktivierung von MAP (*Mitogen Activated Protein*)-Kinasen. Diese wiederum können auch durch Proteinkinase C aktiviert werden, wenn die Zellen mit dem Phorbolester TPA stimuliert werden (van Dam und Castellazzi, 2001; Didieu und Lefebvre, 2006).

Der MAP-Kinase-Weg kann nun zu einer gesteigerten *de-novo*-Synthese der einzelnen Proteine führen oder auch den Phosphorylierungsgrad nachhaltig verändern. So sind die MAP-Kinasen in der Lage, im Nukleus TCFs (*Ternary Complex Factors*) zu phosphorylieren, was wiederum durch Bindung an den entsprechenden Promotoren zur Induktion der Fos-Gene und damit zu vermehrter Fos:Jun-Dimer-Bildung führt, da auch die Jun-Gene induziert werden. Andererseits können im MAP-Kinase-Weg auch JNKs (*c-Jun N-terminal Kinases*) aktiviert werden, die c-Jun an der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (Ser63 und Ser73) im Dimer phosphorylieren können. Diese Phosphorylierungen beeinflussen so die Aktivität der Proteine in der Genexpression. Zusätzlich eröffnen sie aber auch neue Stimulationsmöglichkeiten für andere extrazelluläre Stimuli (van Dam und Castellazzi, 2001; Didieu und Lefebvre, 2006).

Neben dem MAP-Kinase-Signalweg spielt auch der Ubiquitin-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle, da durch Stimulus-abhängigen Proteinabbau die andauernde Proteinstabilität nachhaltig reguliert werden kann (Musti *et al.*, 1997)

Schließlich ist die Aktivität und Funktion der jeweiligen Dimere abhängig vom Zelltyp, dem Differenzierungsstadium und dem Einfluss der jeweiligen physiologischen oder pathologischen Stimulanzen.

Physiologische Bedeutung von AP-1

Allgemein beschrieben kontrollieren die dimerisierten AP-1-Komplexe Zellproliferation und Zelldifferenzierung durch die Regulation der Genexpression als Antwort auf positive und negative Stimuli (van Dam und Castellazzi, 2001). Interessant ist, dass die einzelnen UE von AP-1 in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich exprimiert und reguliert werden. Jede Zellart besitzt also eine unterschiedliche Zusammensetzung der gebildeten Homo- und Heterodimere, die wiederum auch verschiedenste Funktionen haben (Hess *et al.*, 2004). Im Folgenden sind die wichtigsten bzw. für die Arbeit relevanten aufgeführt.

Proliferationsregulation

AP-1 moduliert als Antwort auf externe Stimuli die Proliferation der Zellen durch die Regulation der Expression und Funktion verschiedener Zellzyklus-Regulatoren wie Cyclin D1, Cyclin A, *p53*, *p21*, *p16* und *P19*. Abbildung 4 stellt dies schematisch da:

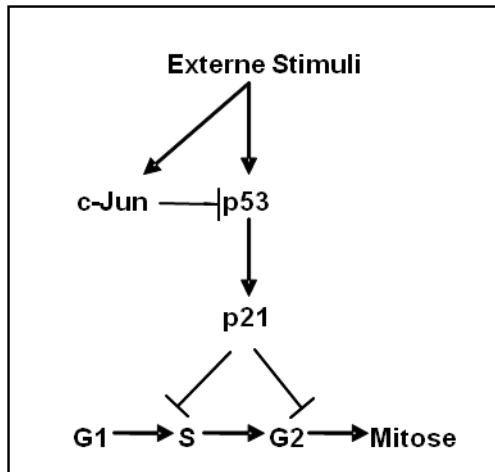


Abb. 4: Einfluss von AP-1 auf die Proliferation von Zellen (modifiziert nach Shaulian *et al.*, 2002)

Externe Stimuli beeinflussen sowohl die Expression von c-Jun als auch das Tumorsuppressorgen *p53*. Zusätzlich wirkt sich AP-1 auf die transkriptionelle Aktivierung und die Expression von *p53* aus. Dadurch kann *p53* als Transkriptionsfaktor u.a. *p21* regulieren, wodurch wiederum der Einfluss von *p21* auf den Zellzyklus verringert wird.

Die Möglichkeit, sowohl fördernd als auch supprimierend auf den Zellzyklus zu wirken, ist durch verschiedene Regulatoren geschaffen, die in unterschiedlichen Konzentrationen in den Zelltypen vorliegen und die zum Teil von den AP-1-UE kontrolliert werden können. So spielt Jun beispielsweise eine zentrale Rolle bei der Proliferation von Hepatozyten, Keratinozyten und Fibroblasten, während Jun-D und Jun-B die Entwicklung lymphoider Zellen beeinflussen (Hess *et al.*, 2004).

Apoptoseregulation

AP-1 bewirkt in einigen zellulären Systemen das Überleben, während es in anderen zum apoptotischen Zelltod führt. Dies zeigt Abbildung 5 schematisch. Prinzipiell erfolgt die Induktion der Apoptose häufig über den extrinsischen Todesrezeptor-Signalweg. Dabei werden durch Stressfaktoren wie proinflammatorische Cytokine und UV-Strahlung in der Zelle letztendlich spezielle JNKs aktiviert. Sie können unter anderem durch die Phosphorylierung von c-Jun schließlich zu einer erhöhten Transkription bestimmter Gene beitragen, was dann zur zellulären Stress-induzierten Apoptose führt. Neben Jun bindet beispielsweise auch FasL an die entsprechenden Zielgene (Eichhorst *et al.*, 2000).

Auf der anderen Seite ist die Jun-Expression auch wichtig, um beispielsweise die Apoptose in fetalen Hepatocyten zu unterdrücken und so die vollständige, embryonale Entwicklung zu gewährleisten (Behrens *et al.*, 1999).

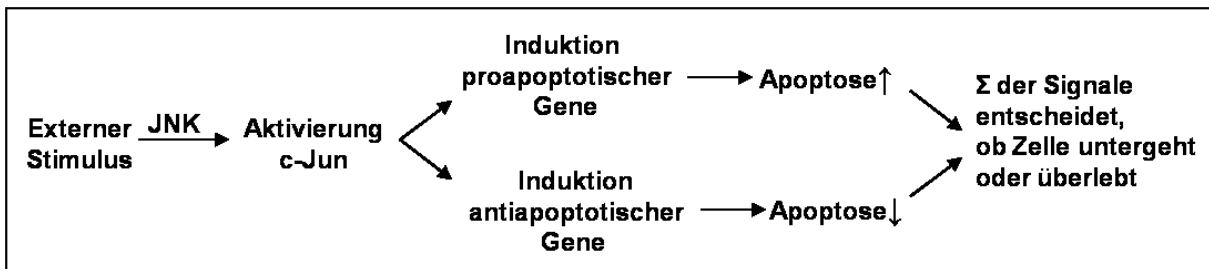


Abb. 5: Übersicht zum pro- und antiapoptotischen Einfluss von AP-1 auf Zellen (modifiziert nach Shaulian *et al.*, 2002)

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Funktionen von AP-1, hier beispielhaft an c-Jun beschrieben, zum einen vom genauen Differenzierungsgrad der Zelle abhängen und zum anderen die Summe der durch AP-1 angeregten Signale bestimmt, ob die Zelle untergeht oder nicht.

Onkogene Regulation

Die Induktion des gesamten onkogenen Ablaufs erfolgt allem Anschein nach in einigen Fällen über das konstitutiv aktive Proto-Onkogen Ras und Ras-verwandte Faktoren. G-Protein-Rezeptor-vermittelt sorgt Ras für eine Aktivierung von MAP-Kinasen, beispielsweise ERK (*Extracellular Signal Regulated Kinases*), die auf physiologischem Weg durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden und die Proliferation und Differenzierung der Zellen beeinflussen. ERKs phosphorylieren anschließend im Nukleus TCFs, wodurch es letztendlich, vergleichbar mit dem physiologischen Geschehen, Fos- und Jun-Gene induziert werden. Viele Studien haben ergeben, dass Dimere aus Jun mit unterschiedlichen Dimerisierungspartnern aus der AP-1-Familie ein erhöhtes onkogenes Potential besitzen. Dabei scheinen Jun:Fos-Dimere eine besonders wichtige Rolle zu spielen (Wagner *et al.*, 2001).

So ist das Gleichgewicht aus Differenzierung, Zellüberleben und Apoptose durch Beeinflussung eines eigentlich physiologischen Signalwegs nachhaltig gestört und die Voraussetzungen für eine onkogene Entwicklung in der Zelle sind geschaffen (Suzuki *et al.*, 1994).

Interaktion von AP-1-Proteinen und STAT3

Die Transkriptionsfaktoren AP-1 und STAT3 haben sehr ähnliche Funktionen, sodass die Frage aufkam, ob zwischen ihnen Interaktionen stattfinden.

Von der Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen von Biopsien kolorektaler Karzinome ergaben eine um den Faktor 2 erhöhte spezifische DNA-Bindungskapazität der Transkriptionsfaktoren, wenn diese gemeinsam in den Zellen vorkamen (Daten nicht gezeigt). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen hyperaktivem STAT3 und AP-1 existiert (Corvinus *et al.*, 2005). Dazu kommen die Ergebnisse von Schaefer *et al.*, der 1995 erstmals den Komplex aus STAT3 β und c-Jun nachweisen konnte. Durch kristallographische Untersuchungen wurden mittlerweile die genauen Bindungsorte detektiert. STAT3 bindet über eine coiled-coil-Domäne (107-377). Dabei ist eine abgeschlossene Phosphorylierung an Y705 wichtig, da so die Bindung siebenfach stärker erfolgt als

unphosphoryliert. Bei c-Jun erfolgt die Bindung über einen Teil der bZIP-Domäne(105-334), die gleichzeitig auch die DNA-Bindungsdomäne enthält. In diesem langen COOH-terminalen Segment ist wiederum R261 ausschlaggebend, wie Mutationsexperimente bewiesen haben. Auch für c-Fos wurde eine entsprechende STAT3-Bindungsstelle ermittelt (R146) (Zhang *et al.*, 1999; Ginsberg *et al.*, 2007).

2.4 Matrixmetalloproteinasen

Matrixmetalloproteinasen in der Karzinogenese und Metastasierung

Matrixmetalloproteinasen spielen wie STATs und AP-1 ebenfalls eine wichtige Rolle im Tumorgeschehen. Sie umfassen eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen, denen die Bindung eines ionisierten Zinkatoms im aktiven Zentrum gemeinsam ist. Bislang sind 26 Matrixmetalloproteinasen identifiziert worden, die in verschiedene Unterklassen eingeteilt werden: Kollagenasen (MMP-1, MMP-8, MMP-13), Stromelysine (MMP-3, MMP-10), Gelatinasen (MMP-2, MMP-9), Matrilysin und Membran-Typ MMPs (Curran und Murray, 1999).

Die ersten vier genannten Mitglieder degradieren als freie Enzyme verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM), wie Kollagene und Laminin. Gleichzeitig können MMPs durch den Abbau der extrazellulären Matrix zur Freisetzung von aktiven Wachstumsfaktoren, Angiogenese-Aktivatoren und -Inhibitoren beitragen (Whitelock *et al.*, 1996; Imai *et al.*, 1997). MMPs tragen zu physiologischen und pathologischen Prozessen bei, die zum Um- und Abbau von Gewebe führen. Zu den physiologischen Vorgängen zählen z.B. die embryonale und fetale Entwicklung, altersbedingte Involutionsprozesse und Wundheilung (Matrisian und Hogan, 1990; Kahari und Saarialho-Kere, 1997; Marchenko *et al.*, 2003).

Von besonderer Bedeutung sind erhöhte MMP-Aktivitäten in Zusammenhang mit malignen Tumoren. MMPs lassen sich in den verschiedensten Tumoren, wie denen des Magens, Dickdarms, Pankreas und Leber nachweisen (Bramhall *et al.*, 1997).

MMPs sind in vielen Tumoren mit Invasion und Metastasierung assoziiert (Westermarck und Kahäri, 1999). Bereits 1991 zeigten Liotta *et al.*, dass der Abbau der Basalmembran und der EZM eine Voraussetzung für die Invasivität und Metastasierung maligner Zellen ist. MMPs als Gewebe-abbauende Proteinase schaffen so eine Tumorumgebung, die die Vergrößerung des primären Tumors und Metastasenbildung zulässt. Daher ist auch nachvollziehbar, dass eine Überexpression von MMPs im Tumor häufig mit einer schlechten Überlebensprognose assoziiert ist (Nikkola *et al.*, 2002).

Der Einfluss von STAT3 und AP-1 auf die Expression von MMP-1

Die MMP-Expression wird durch Wachstumsfaktoren, Stress, onkogene Transformationsprozesse, Zell-Matrix und Zell-Zell-Interaktionen reguliert, aber auch durch Cytokine wie IL-6 und den Phorbolester TPA (Westermarck und Kahäri, 1999; Pardo *et al.*, 2005). Diese wiederum spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von STAT3 und AP-1. So stellte sich die Frage, ob diese Transkriptionsfaktoren an der transkriptionellen Aktivierung von MMP-1 in Kolorektalkarzinom-Zellen beteiligt sind.

2004 zeigten Baba *et al.* durch *in vitro*-Experimente, dass sich vor allem MMP-1 auf die Invasion von kolorektalen Karzinomen auswirkt. In Versuchen mit CRC (*colorektal Carcinom*)-Zelllinien, die STAT3 überexprimieren beziehungsweise eine konstitutiv aktive STAT3-Variante exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die STAT3-Aktivierung zu einer Erhöhung des MMP-1-mRNA-Levels führt. Zur Untersuchung des Einflusses von STAT3 auf die Transkription von MMP-1 wurden außerdem HT-29-Zellen mit einem MMP-1-Luciferase-Reporter-Konstrukt, das die Sequenz für den humanen MMP-1-Promotor enthält, transfiziert. Sowohl die Stimulierung der Zellen mit IL-6, einhergehend mit STAT3-Aktivierung, als auch die Überexpression von STAT3 sowie die Expression einer konstitutiv aktiven STAT3-Variante führten zu einer starken Induktion des MMP-1-Promotors. Dies spricht für den Einfluss von STAT3 auf die Transkriptionsrate von MMP-1 (Tsareva *et al.*, 2007).

Auch für AP-1 konnte gezeigt werden, dass es die MMP-1-Expression reguliert. Wurde in Zellen eine durch Cotransfektionsexperimente hervorgerufene Überexpression von Jun und Fos induziert, kam es zu einer erhöhten Aktivität des MMP-1-Promotors.

Itoh *et al.* untersuchten den gemeinsamen Einfluss von STAT3 und AP-1 auf die MMP-1-Expression. Sie konnten 2006 mit Hilfe verschiedener Protein-DNA-Bindungsassays zeigen, dass STAT3 nach EGF-Stimulation im Komplex mit AP-1 in Blasenkarzinomzellen eine maximale MMP-1-Expression induziert.

Sie stellten die These auf, dass die STAT3-Affinität an die STAT-Bindungsstelle abhängig von AP-1 ist. Bereits 1997 beobachteten Korzus *et al.*, dass die induzierte Expression von MMPs ein Onkostatins-M-responsives Element im MMP-1-Gen voraussetzt, das wiederum nahe beieinander liegende Erkennungssequenzen für die onkogenen Transkriptionsfaktoren AP-1 und STAT3 enthält. Darauf basierend wurde DNA in die Zellen eingebracht, die eine mutierte AP-1-Bindungsstelle enthielt. Trotz EGF-Stimulation fand keine signifikant erhöhte MMP-1-Expression mehr statt. Dies unterlegte die These, nach der durch die Mutation kein aktiviertes AP-1 mehr an die DNA binden kann und dadurch die STAT-Bindungsfähigkeit an die benachbarte DNA eingeschränkt ist.

In Säugerzellen kommt es häufig vor, dass Genloki, die nah beieinander liegen, vielfach durch benachbart bindende Transkriptionsfaktoren mit beeinflusst werden. Dieser Umstand konnte auch bei STAT3 und c-Jun in verschiedenen Genabschnitten dokumentiert werden. So ist c-Jun konstitutiv

präsent auf Promotoren von STAT3-induzierten Genen mit *IL6 Response Elements* IRE zu finden. Dazu zählen beispielsweise das α 2-Makroglobulin-Gen und das SOCS-3-Gen. Daher kommt es auch zu einer IRE-vermittelten Herabregulation, wenn die AP-1-Konzentration durch den Einsatz entsprechender siRNA herabgesetzt ist (Carey, 1998; Lerner *et al.*, 2003; Ginsberg *et al.*, 2007).

Diese Beobachtungen lassen die These zu, dass sich AP-1 und STAT3 kooperativ und unter Umständen im Komplex auf die Regulation von MMPs auswirken.

3 Ziele der Arbeit

STAT3 (*Signal Transducer of Transcription*) und c-Jun, ein Strukturbestandteil von AP-1 (*Activator Protein 1*), liegen als Transkriptionsfaktoren in humanen Zellen vor. Sie werden von Cytokinen und verschiedenen Wachstumsfaktoren aktiviert. Durch die Kernmembran gelangt können sie sich beispielsweise an die MMP-Bindungsstellen lagern, was letztendlich die Expression von Matrixmetalloproteinasen beeinflusst. Diese Enzyme sind an der Ausbildung des malignen Charakters karzinoider Zellen beteiligt. STAT3 und c-Jun spielen so in humanen kolorektalen Tumorzellen bei Ausbreitung und Metastasierung eine wichtige Rolle.

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist der Nachweis, dass sich sowohl STAT3 als auch AP-1 an die MMP-1-Bindungsstelle anlagern können, allerdings ist nicht klar, ob die Bindung gemeinsam oder separat erfolgt. Ziel ist es also, das komplexe Zusammenspiel und die individuellen Beiträge dieser beiden Transkriptionsfaktoren an der MMP-1-Bindungsstelle genauer zu erforschen.

Mit der Kolorektalkarzinom-Zelllinie HT-29 wurde bereits die Möglichkeit geschaffen, durch verschiedene Kulturbedingungen Teilaspekte der Situation im Tumor nachzustellen. Durch verschiedene DNA-Bindungsassays (ABCD und CHIP) sollen die Protein-DNA-Interaktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren und ihren korrespondierenden Erkennungssequenzen charakterisiert werden. Außerdem soll in Reporteragen-Analysen die Wirkung beider aktivierter Faktoren auf die transkriptionelle Aktivierung des MMP-1-Promotors untersucht werden. Dies geschieht mit Hilfe von Kostimulationen, welche die Aktivität der verschiedenen Faktoren gewährleisten, sowie wildtypischen und mutierten Promotorfragmenten, welche STAT3- und AP-1-Bindungsstellen enthalten. Zusätzlich soll überprüft werden, ob STAT1 (als strukturell STAT3 sehr ähnlicher Faktor) in der Lage ist, STAT3 im Komplex mit AP-1 partiell zu substituieren.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Bakterienstämme und Medien

Für Klonierungsarbeiten und zur Plasmidamplifikation wird der *E. coli*-Stamm Top10 (Novagen) verwendet.

LB-Medium: 1,0% Bacto-Trypton (DIFCO); 0,5% Hefeextrakt (DIFCO);
1,0% NaCl in ddH₂O lösen und mit NaOH auf pH 7,5 einstellen
Agarplatten: 1,5% Bacto-Agar (DIFCO) in LB-Medium

Alle Medien werden vor Verwendung bei 121°C für 20min autoklaviert. Für Selektivmedien werden zum LB-Medium bzw. zu der noch warmen LB-Agar-Lösung 100µg/ml Ampicillin gegeben.

4.1.2 Zelllinien und Medien

Zelllinie	Beschreibung	benötigtes Medium
HT-29	Humane Kolonadenomkarzinomlinie (DSMZ, ACC299), 1964 etabliert, adhärente, epitheloide Zellen, die als Monolayer in großen Kolonien wachsen, Verdopplungszeit: 40-60h	RPMI 1640 (Invitrogen) mit 10% FKS (PAA) und 1% Gentamycin

4.1.3 Cytokine

IL6: Invigate (100ng/ml)
TPA: Alexis Biochemicals (100nM)
IFN γ : ImmunoTools (100ng/ml)

4.1.4 Plasmide

Name	Beschreibung
pGL3-MMP1	MMP-1- <i>firefly</i> -Luciferase-Reportergen (Rutter <i>et al.</i> , 1998), wird verkürzt und z.T. mutiert als 0,6kb Fragment in Reportergenassays eingesetzt
pRenilla-TK-luc	Luciferase-Reportergenplasmid, zur Kontrolle und Normierung der Ergebnisse in Reportergenassays, beinhaltet ein <i>Renilla</i> -Luciferasegen, welches bei 480nm luminesziert (<i>Firefly</i> -Luciferase: 550-570nm)
pEGFP-N1	,enhancend GFP'-Plasmid, geeignet für Proteinfusionen an den N-Terminus des EGFP und der Lokalisation des Proteins intrazellulär, auch geeignet und hier eingesetzt als Transfektionsmarker (Firma Clontech)

4.1.5 Primer für PCR

Alle Primer werden von der Firma Metabion bezogen. Sie werden in der PCR der Chromatinimmunopräzipitation verwendet.

Name	Sequenz 5'→3'	Kommentar
MMP1D mit AP-1 forward	gcagagtgtgtctccttcgcac	PCR
MMP1D mit AP-1 reverse	aggttaagtgatggcttcccagc	PCR

4.1.6 Oligonucleotide für Bindungsassay

Alle Oligonucleotide werden von der Firma Metabion bezogen. Sie werden im ABCD- Bindungsassay verwendet.

Name	Sequenz 5'→3'
MMP1A sense	AATTTCCGGGAAAAG
MMP1A antisense	CTTTTCCCGGAAATT
MMP1B sense	GAACTTCTTGGAAGTAT
MMP1B antisense	ATAGTTTCCAAGAAGTTC
MMP1C sense	GTTTCAGGGAAGGAT
MMP1C antisense	ATCCTTCCCTGAAAC
MMP1D sense	TGGCTTTCTGGAAGG
MMP1D antisense	CCTTCCAGAAAGCCA
MMP1E sense	TCTTCCATGAATACC
MMP1E antisense	GGTATTCATGGAAGA

Name	Sequenz 5'→3'
MMP1F sense	TGCTTCCAAGGAAGG
MMP1F antisense	CCTTCCTTGAAGCA
AP1-MMP1D sense	GCATGAGTCAGACACCTCTGGCTTTCTGGAAGG
AP1-MMP1D antisense	CCTTCCAGAAAGCCAGAGGTGTCTGACTCATGC
AP1 sense	GCATGAGTCAGACAC
AP1 antisense	GTGTCTGACTCATGC
mtMMP1D sense	TGGCTTTCTATCAGG
mtMMP1D antisense	CCTGATAGAAAGCCA
GRE sense	CGGTACATTTTGTCTAGAACAAAATGTACCGGTAC
GRE antisense	GAAAATGTACCGGTACATTTTGTCTAGGACAAAATGTACCG

4.1.7 Antikörper

Bezeichnung	Anwendung/ Verdünnung	Epitop, Zielmolekül	Spezies	Bezugsquelle
anti-Stat3	WB: 1:1000	Stat3 (His 190)	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
anti-phospho-Tyr- 705-Stat3	WB: 1:1000 ChIP	phospho-Stat3 (Tyr 705)	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
anti- c- Jun	WB: 1:1000 ChIP	c-Jun, aminoterminal Sequenz	Kaninchen IgG	Cell Signaling Technology
IgG	ChIP	unspezifisch	Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology
Goat- anti- rabbit	WB: 1:10000	primärer Antikörper (Kaninchen)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology

4.1.8 DNA-Größenstandard

10kb Ladder	Fermentas
50kb Ladder	Fermentas

4.1.9 Proteingrößenstandard

SDS-7B2 (180; 116; 90; 58; 48,5; 36,5; 26,6 kDa)	Sigma
---	-------

4.1.10 Chemikalien und Feinchemikalien

Acrylamid, Rotiphorese Gel 40 (Carl Roth GmbH & Co.)

Agarose (Biozym)

Ammoniumpersulfat (Serva Electrophoresis GmbH)

Ampicillin (Carl Roth GmbH & Co.)

Bromphenolblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

BSA (Carl Roth GmbH & Co.)

Calciumchlorid (Merck)

Chloroform (Carl Roth GmbH & Co.)

Dinatriumhydrogenphosphat (Carl Roth GmbH & Co.)

DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)

dNTPs (Fermentas)

DTT (Boehringer Mannheim)

EDTA (Appli Chem)

Essigsäure (Carl Roth GmbH & Co.)

Ethanol (Carl Roth GmbH & Co.)

FKS (PAA Laboratories GmbH)

Formaldehyd (Carl Roth GmbH & Co.)

Gelatine (Serva Electrophoresis GmbH)

Gentamycin (Gibco BRL)

Glycerin (Carl Roth GmbH & Co.)

Glycin (Carl Roth GmbH & Co.)

Glykogen (Carl Roth GmbH & Co.)

Hefeextrakt (Carl Roth GmbH & Co.)

HEPES (Carl Roth GmbH & Co.)

Heringssperma (Invitrogen)

Isopropanol (Carl Roth GmbH & Co.)

Injektionswasser (Braun)

Kaliumchlorid (Merck)

Kaliumdihydrogenphosphat (Carl Roth GmbH & Co.)

Lithiumchlorid (Carl Roth GmbH & Co.)
Magnesiumchlorid (Carl Roth GmbH & Co.)
Magnesiumsulfat (Carl Roth GmbH & Co.)
Mercaptoethanol (Carl Roth GmbH & Co.)
Metafectene pro (Biontex)
Methanol (Carl Roth GmbH & Co.)
Milchpulver (Carl Roth GmbH & Co.)
MOPS (Carl Roth GmbH & Co.)
Natriumchlorid (Carl Roth GmbH & Co.)
Natriumdesoxycholsäure (Carl Roth GmbH & Co.)
Natriumazid (Carl Roth GmbH & Co.)
NP-40 (Serva Electrophoresis GmbH)
Nucleobond AX-System (Macherey-Nagel)
Paq 5000 (Stratagene)
PIPES (Carl Roth GmbH & Co.)
Proteaseinhibitor complete Mini (Roche Diagnostics GmbH)
Proteinase K (New England Biolabs)
Protein- A- Sepharose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Phosphataseinhibitor complete Mini (Roche Diagnostics GmbH)
Ribonuklease A (Carl Roth GmbH & Co.)
Roti-Quant® Bradford Reagenz (Carl Roth GmbH & Co.)
RPMI 1640 w Glutamine (Cell Signalling Technology)
Salzsäure (Carl Roth GmbH & Co.)
SDS (Serva Feinbiochemica GmbH & Co.)
Sulfosalicylsäure (Carl Roth GmbH & Co.)
TEMED (Serva Electrophoresis GmbH)
Tris (Carl Roth GmbH & Co.)
Trypanblau (Merck)
Trypsin-EDTA (Biochrom AG)
Trypton X (Carl Roth GmbH & Co.)
Tween-20 (Carl Roth GmbH & Co.)
Xylenecyanol FF (Serva Feinbiochemica GmbH & Co.)

4.1.11 Geräte und Zubehör

Amaya-Nukleofektor Nucleofector I (AMAXA GmbH)

Einmal-Küvetten (Brand)

FACS-Scan (BD)

Glomax 95-Microplate-Luminometer (Promega)

Hielscher UP100H Ultraschall-Gerät

Kulturgefäße: 17,5 ml-, 250 ml-, 1000 ml-Kulturflaschen für Suspensionskulturen (Greiner)

Mastercycler personal (Eppendorf)

Nukleofektions-Küvetten (AMAXA GmbH)

6- und 12- Well-Platten (Greiner)

Petrischalen (Greiner)

Plastikröhrchen, steril: 15ml, 50 ml (Greiner)

Power-Pack (BioRad)

Spekol 1200 (Analytik AG, Jena)

2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)

UV-Photometer (Pharmacia Biotech)

Zellkulturschalen beschichtet (Greiner)

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Herstellung chemokompetenter E.coli-Zellen

Ein 500ml-Schikanekolben mit 200ml LB + 20mM MgSO₄ wird mit 10µl einer Vorkultur inokuliert, diese wurde am Tag zuvor angesetzt (5ml-Vorkultur (LB + 20mM MgSO₄)). Die Bakterienkultur wird bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1-0,3 angezogen. Anschließend wird die Kultur auf vier 50ml-Röhrchen aufgeteilt und diese für 10min bei 4°C und 4700xg zentrifugiert. Die Pellets werden in 20ml eiskaltem TfbI vorsichtig aufgenommen und 30min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 10min) werden die Pellets in 4ml eiskaltem TfbII vereinigt, zu je 10µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

TfbI-Puffer: 50mM MnCl₂ x 4 H₂O; 100mM KCl; 10mM CaCl₂ x 2 H₂O;
30mM KAcetat; 15% Glycerin; pH 6,1 mit verdünnter Essigsäure einstellen

TfbII-Puffer: 10mM MOPS; 75mM CaCl₂; 100mM KCl; 15% Glycerin; pH 7,0 mit KOH einstellen

4.2.2 Transformation kompetenter E.coli-Zellen

Die Transformation von Plasmiden zu ihrer Amplifikation erfolgt in den oben beschriebenen chemokompetenten E.coli-Zellen. 100µl Zellsuspension werden langsam auf Eis aufgetaut und 0,1-1µg Plasmid-DNA oder 10µl Ligationsansatz dazugegeben. Nach 10min Inkubation des Ansatzes auf Eis wird der Ansatz für 1min einem Hitzeimpuls von 42°C warmen Wasserbad ausgesetzt. Nach weiteren 15min auf Eis erfolgt die Zugabe von 1ml LB-Medium und die Inkubation der Suspension für 45-60min im Schüttler bei 37°C, dabei kann sich der Stamm erholen und das auf dem Plasmid zur Selektion befindliche Resistenzgen exprimieren. Die Zellsuspension wird im Anschluss 3min bei 4700xg zentrifugiert, der Überstand entfernt, das Pellet in 100µl LB-Medium resuspendiert. Im Anschluss wird eine 1:10- und eine 1:100-Verdünnung auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.3 Gießen von Agarplatten

Für 20 Agarplatten werden 500ml steriler LB-Agar in der Mikrowelle geschmolzen und anschließend auf 40°C abgekühlt. Daraufhin wird je nach Bedarf und in Abhängigkeit von den transformierten Plasmiden Antibiotika hinzugegeben:

	Konzentration (Stammlösung)	Konzentration im LB-Agar	Zugabe zu 500ml LB-Agar
Ampicillin	100 mg/ml (in H ₂ O)	100 µg/ml	500µl

Anschließend werden etwa 25ml des LB-Agars in eine Petri-Schale gegossen (5mm Agarschicht) und offen getrocknet.

4.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli-Zellen

Aus den transformierten, auf Agarplatten gewachsenen E.coli-Zellkolonien wird eine Vorkultur angesetzt. Dazu pickt man eine Kolonie von dieser Platte und überführt sie in ein Reagenzglas mit 5ml LB-Medium und 5µl Ampicillin. Diese Vorkultur inkubiert für etwa 6h in einem Schüttler bei 37°C. Nach dieser Zeit sollte die Kultur eine sichtbare Trübung zeigen. Daraus entnimmt man 150µl und überführt sie in einen 500ml-Schüttelkolben, in diesem befinden sich 150ml LB-Medium und 150µl Ampicillin. Diese Hauptkultur wird über Nacht im Schüttelschrank bei 37°C inkubiert.

Die Plasmidisolierung aus Hauptkulturen werden mit dem Nucleobond AX-System (Macherey-Nagel) nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Zunächst werden die Zellen bei 4700xg für 20min abzentrifugiert der Überstand wird verworfen, das Pellet mit Resuspensionspuffer (S1 mit RNase) aufgenommen. Es erfolgt die Zugabe des Lysepuffers (S2) und anschließend inkubiert die Suspension für 5min, bevor man Neutralisationspuffer (S3) zugibt. Damit wird die Suspension neutralisiert, die chromosomale DNA fällt aus.

Mit Hilfe eines Filterpapiers werden die Zellbestandteile abgetrennt, das Filtrat wird auf eine AX100-Säule gegeben (Equilibration mit Puffer N2). Es handelt sich hier um eine Silica-Anionen-Austauschersäule, die das Plasmid bindet. Es wird mehrfach mit Waschpuffer N3 gewaschen, anschließend erfolgt mit Puffer N3 die Elution der Plasmid-DNA. Nach der Zugabe von Isopropanol präzipitiert die Plasmid-DNA und wird bei 4°C und 4700xg für 50min abzentrifugiert. Das entstandene Pellet wird mit 70% Ethanol versetzt, erneut abzentrifugiert, getrocknet und in 100µl destilliertem Wasser gelöst. Zur dauerhaften Lagerung wird die Plasmid-DNA bei -20°C aufbewahrt.

4.2.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Aus der oben beschriebenen Probe wird mit destilliertem Wasser eine 1:100-Verdünnung angesetzt, diese wird im UV-Photometer in Quarzküvetten bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen, eine gemessene OD₂₆₀ entspricht 50µg/ml doppelsträngiger DNA.

4.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgt je nach Größe in 0,8 bis 1 %igen TAE-gepufferten Agarosegelen. Die Geschwindigkeit, mit der die negativ geladene DNA zur Anode wandert, ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Die Elektrophorese erfolgt in 1x

TAE-Puffer bei einer Spannung von 100V. Zum Auftragen auf das Gel werden die DNA-Proben mit Probenpuffer versetzt (Endkonzentration 1x).

Um die DNA sichtbar zu machen wird dem Gel beim Gießen 0,5µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, welches zwischen die Nucleotidbasen der DNA interkaliert und bei 366nm auf dem UV-Transiluminator angeregt wird.

1x TAE-Puffer: 40 mM Tris/HCl; 20 mM NaAcetat; 2 mM EDTA; pH 8,0

6x Probenpuffer: 0,09% Bromphenolblau; 0,09% Xylencyanol; 60% Glycerin;
60 mM EDTA

4.2.7 ABCD

Bei einem ABCD- Assay (Avidin-Biotin-Complex-DNA) handelt es sich, wie beim EMSA, um ein *in vitro* Protein-DNA-Bindungsassay. Dabei binden Agarose-Beads gekoppelte Streptavidin-Moleküle an 5'-biotinylierte DNA, an die wiederum Transkriptionsfaktoren gebunden haben. Dieser Komplex (Abbildung 6) wird durch mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte von der restlichen Zelllösung separiert und kann durch SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden (Baumann *et al.*, 2005).

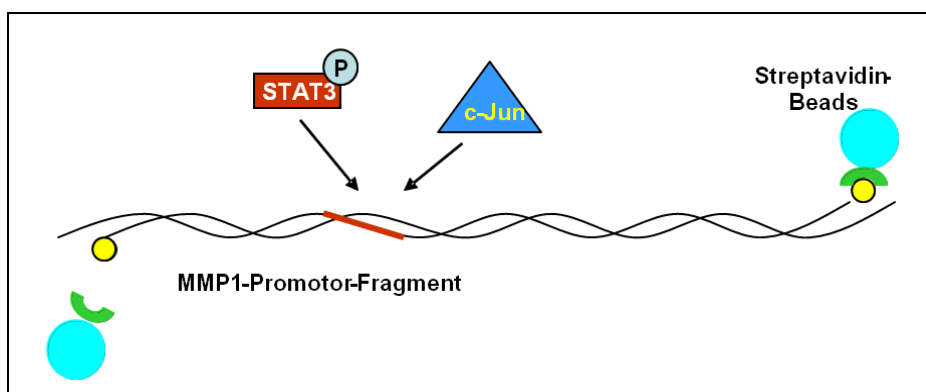


Abb. 6: Schematisch dargestellter Komplex eines ABCD

Annealing der biotinylierten Oligonukleotide

Die Auswahl und Synthese der sense- und antisense-Oligonukleotide erfolgt entsprechend der zu untersuchenden DNA-Bindungsregion, entspricht also dem Forward- und Reverse-Strang. Die produzierten Oligonukleotide müssen anfangs zu zweisträngig, einseitig biotinylierter DNA zusammen gelagert werden.

Dabei wird die lyophilisierte DNA in Wasser gelöst, sodass eine Konzentration µg/µl erreicht wird. Sense- und Antisense-Oligonukleotide werden zu gleichen Teilen (je 40µl) zusammen gegeben. Zusätzlich werden 10µl Annealing Puffer hinzu pipettiert. Diese Lösung wird sofort auf Eis gestellt.

Gleichzeitig wird Wasser auf 100°C erhitzt. Hier hinein werden Safe-Lock-Tubes mit der DNA-Lösung gegeben und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Annealing Puffer: *0,5M NaCl, 0,2M Tris pH 7,4*

Um zu überprüfen, ob das Annealing gelang, werden Proben á 100-200µl von Sense-, Antisense- und hybridisierter DNA auf einem 20% natives Polyacrylamidgel aufgetrennt.

20% Polyacrylamidgel: *66,6% Acrylamid (30%), 12,7% Wasser, 20% 5x TAE,
Ammoniumpersulfat und TEMED*

Zelllysate

Zelllysate werden aus Zellen hergestellt, die je nach Versuch 30min stimuliert und anschließend mit NET-N behandelt wurden. Um die Kernmembran zu zertrümmern, wird das Zelllysate zusätzlich einer Ultraschallbehandlung unterzogen: 10s, Cycle 0,5, Amplitude 40.

Bindungsreaktion

Zelllysate und amplifizierte DNA werden unter folgenden Bedingungen zusammen gebracht:

200µl Puffer H

200µl Zelllysate

2µl Heringssperma

2µl DNA-Hybrid

Der Mix wird für 5min bei 37°C und für 60min auf Eis inkubiert. Dabei kommt es zur Komplexbildung zwischen DNA mit angelagerten Transkriptionsfaktoren und den Oligonukleotiden.

Puffer H: *0,5M HEPES, 1M KCl, 50%Glycerol, 1M DTT, 0,1%NP40, a.d. 50ml mit Wasser*

Proben und Beads

Bevor die Beads zu den Proben gegeben werden können, müssen sie äquilibriert werden. Dazu werden 0,5ml gelöste Beads (auf 4 Proben) mehrmals 2min bei 2xg zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und die pelletierten Beads in 1ml Puffer H resuspendiert. Anschließend werden sie in 1ml Puffer H mit 0,5mg Natriumazid und 5mg BSA abgesättigt; dazu werden sie 60min bei 4°C rotiert. Danach können 40µl Beads pro Probe hinzugegeben werden- dieses Gemisch wird wiederum mindestens 30min rotiert, um die Anlagerung der Beads an die biotinylierte DNA zu erreichen.

Waschschritte und SDS-PAGE

Anschließend werden die Proben für 2min bei 2xg abzentrifugiert, der Überstand wird abgesaugt und danach werden die Beads in 1ml eiskaltem Puffer H resuspendiert. Dieser Vorgang wird mehrmals wiederholt, sodass zum Schluss nur noch die Beads im Komplex mit DNA, Oligonukleotiden und Transkriptionsfaktoren vorliegen.

Zum Schluss wird der Restpuffer mit einer dünnen Einwegspritze weggesaugt und die trockenen Beads werden in 25µl 3x Lämmli-Puffer ausgeschwemmt.

Diese Proben können anschließend aufgekocht und für SDS-PAGE und Western Blot genutzt werden. Dabei gelangen nur die zuvor gebundenen Transkriptionsfaktoren auf die Membran und können so bei einer entsprechenden Immunodetektion nachgewiesen werden.

4.2.8 Chromatinimmunpräzipitation (ChIP)

Im Gegensatz zu ABCD und EMSA handelt es sich bei der ChIP um ein „*in vivo*“ Bindungsassay. Dabei wird isolierte, zelluläre DNA für die Untersuchung eingesetzt, wodurch die ChIP das natürliche Zellgeschehen besser abbildet als die *in vitro* Verfahren ABCD und EMSA.

Auch hier binden Beads an DNA, an die wiederum die Transkriptionsfaktoren gebunden haben. Die entstandenen Komplexe werden durch mehrere Waschschritte von der restlichen Zelllösung separiert und die gebundene DNA kann nach Auflösung der Komplexe in einer PCR nachgewiesen werden:

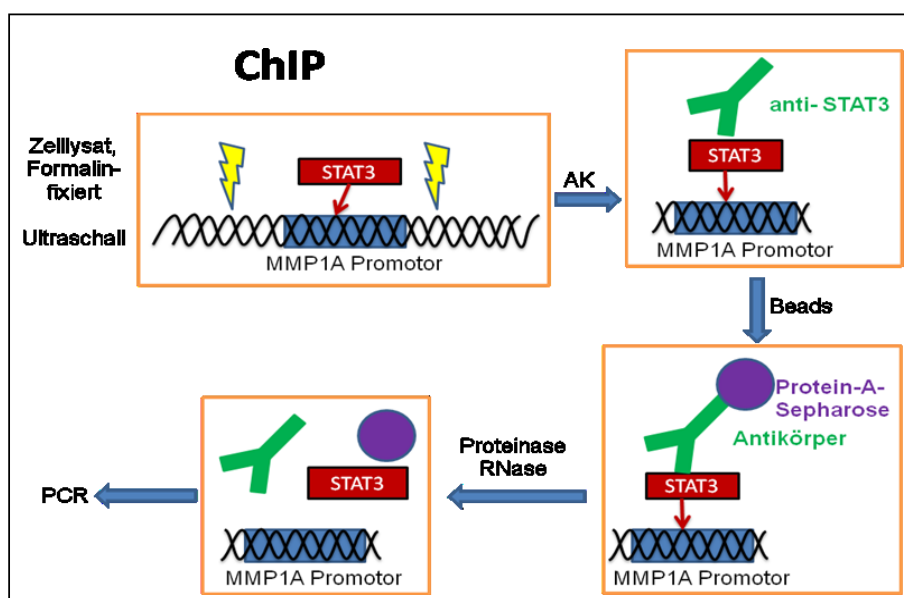


Abb. 7: Schematischer Ablauf einer Chromatin-Immunpräzipitation

Details siehe Text

Fixierung und Chromatin- Isolierung

Nachdem Zellen in Zellkulturschalen konfluent gewachsen sind, werden sie mit PBS gewaschen. Anschließend gibt man 1% Formaldehyd in PBS gelöst auf die Zellen, um sie zu fixieren. Waschen mit PBS und Zelllysispuffer schließt sich an. Nach dem Abschaben vom Schalenboden werden die Zellverbände durch Behandlung mit einem Homogenisator aufgelöst.

Ultraschall und DNA- Bestimmung

Die abzentrifugierten Zellen werden durch Ultraschall (Cycle 0,5, Amplitude 40) aufgeschlossen und die DNA fragmentiert. Die Bestimmung der Fragmentgröße und DNA-Menge erfolgt durch eine Phenol-Chloroform-Fällung und sich anschließende Agarose-Gelelektrophorese.

25-50µg DNA werden für einen ChIP- Ansatz eingesetzt. Dazu wird die Chromatinprobe mit RIPA-Puffer auf 200 µl Probenvolumen aufgefüllt und 20µl mit BSA und Natriumazid abgesättigte Protein-A-Sepharose (Sigma) zugegeben. Es folgt eine 30minütige Überkopf-Inkubation bei 4°C. So können unspezifische Bindungen vermindert werden. Nach sich anschließender Zentrifugation wird zum Überstand ca. 2µg Antikörper gegeben und die Lösung über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler belassen. So kann der Antikörper die an die DNA gebundenen Transkriptionsfaktoren binden.

Anschließend werden 35µl Protein-A-Sepharose hinzugegeben und für 1h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach werden die Beads abzentrifugiert (2min, 4°C, 1080xg) und der Überstand abgesaugt. Es folgen 2-3 Wasch- und Zentrifugationsschritte mit jeweils 1ml RIPA-Puffer, Washing- Puffer und TE-Puffer. Damit werden alle Überreste des Probelysates und ungebundenem Antikörper gewegewaschen. Zum Schluss liegen nur noch die Beads mit gebundenem Antikörper, Transkriptionsfaktor und daran gebundener DNA vor.

Danach werden zu den Beads 1µl RNase (10mg/ml) und 200µl TE-Puffer gegeben und für 1h bei 37°C verdaut. Parallel wird zu Kontrollzwecken eine Input-Probe hergestellt, in dem zu reinem Zelllysat (10% der eingesetzten DNA), welches nicht die vorherige Behandlung durchlaufen hat, 200µl TE und 1µl RNase gegeben und ebenfalls 1h inkubiert wird.

Anschließend werden 50µl 5x Proteinase K Puffer und 3µl Proteinase K (20mg/ml) zu jeder Probe hinzugefügt. So werden die Bindungen im Komplex gelöst und die Antikörper zerstört, sodass letztendlich nur noch die gelösten Beads und die herausgefilterten DNA- Fragmente vorliegen. Die Probe wird nach 6h bei 65°C bei 20800xg für 10min bei 4°C abzentrifugiert.

Mit dem Überstand erfolgt eine Phenol- Chloroform-Fällung, sodass die DNA zum Schluss als Pellet vorliegt, welches in 50µl H₂O gelöst wird. Es folgt die PCR zum Nachweis der DNA- Fragmente. Damit wird die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA bewiesen.

<i>Cell Lysis Puffer:</i>	<i>5mM PIPES (pH 8,0), 85mM KCl, 0,5% Nonidet P-40, Protease Inhibitor</i>
<i>RIPA Puffer:</i>	<i>50mM TRIS-HCl (pH 8,0), 150mM NaCl, 0,1% SDS, 1% NP40, 0,5% Na-Desoxycholsäure, Protease Inhibitor</i>
<i>Washing Puffer:</i>	<i>100mM TRIS-HCl (pH 8,0), 500mM LiCl, 1% NP40, 1% Na-Desoxycholsäure, Protease Inhibitor</i>
<i>TE Puffer:</i>	<i>1mM EDTA- NaOH (pH 7,5), 10mM TRIS-HCl (pH 8,0), Protease Inhibitor</i>
<i>5x PK Puffer:</i>	<i>50mM TRIS-HCl (pH 7,5), 25mM EDTA, 1,25% SDS</i>

PCR zur Amplifizierung der DNA-Fragmente

Die Reaktion findet in einem Gesamtvolumen von 50µl statt.

Komponente	Endkonzentration/ eingesetzte Menge
10x Paq-Puffer (Stratagene)	5µl
Paq-Polymerase (Stratagene)	0,2µl
dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid) (Fermentas)	0,25µl
Forward Primer (gcagagtgtgtctccttcgcac)	1µl
Reverse Primer (aggtaagtgatggcttcccagc)	1µl
gewonnene DNA-Probe	2µl
ddH ₂ O zum Endvolumen	40,55µl

Die Ansätze wurden mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:

Denaturierung	95 °C 7 min	}	1 Zyklus
Denaturierung	95 °C 30s		31 Zyklen
Annealing	57 °C 30s		
Elongation	72 °C 10s		
	72 °C 2min		

4.3 Zellbiologische Methoden

4.3.1 Kultivierung und Passagierung von Säugetierzellen

Die Zelllinie HT-29 wird in 25cm² bzw. 75cm² Zellkulturflaschen steril in Kompletmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgt in einem Brutschrank für Zell- und Gewebekulturen mit CO₂-Begasung bei 37°C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchte.

Die Passagierungen und der Mediumwechsel werden der jeweiligen Zelldichte der adhären Zellen angepasst. Bei einer Konfluenz von 80-90% werden die Zellen mit 5ml sterilem PBS gewaschen, anschließend mit 3ml Trypsin-EDTA für 5min im Brutschrank inkubiert, in Kompletmedium überführt und bei 1.000 x g für 5min abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet in Kompletmedium resuspendiert und auf Kulturflaschen in den gewünschten Verdünnungen ausgesät.

PBS: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O; 1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,3

4.3.2 Inkulturnahme und Kryokonservierung von humanen Zellen

Um die Zellen in flüssigem Stickstoff einfrieren zu können werden sie nach dem Trypsinieren zuerst in Kompletmedium resuspendiert, abzentrifugiert und anschließend in Einfriermedium (Kompletmedium + 10% DMSO) aufgenommen. Je 1,5ml dieser Zellsuspension werden in ein Schraubdeckelröhrchen überführt und zunächst für mindestens 2 Tage bei -80°C gelagert. Danach können die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Die Zellen werden zum Auftauen aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein Wasserbad mit 37°C überführt und dann in 10ml Kompletmedium aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (0,2xg, 5min) wird das Zellpellet in 10ml Kompletmedium resuspendiert und in Kulturflaschen ausgesät.

Da DMSO toxisch für die Zellen ist, müssen die Arbeitsschritte, in denen es den Zellen zugesetzt ist, möglichst zügig ausgeführt werden. DMSO wird verwendet, um die Kristallbildung während des Einfriervorgangs herab zu setzen.

4.3.3 Bestimmung der Zellzahl einer Kultur

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgt nach Vitalfärbung mit Trypanblau (4%) durch Auszählen in einer Zählkammer (Neubauer).

4.3.4 Stimulierung von Zellen

Zur Stimulation von HT-29-Zellen wird dem serum- und antibiotikafreiem RPMI 1640-Medium entweder 100ng/ml IL-6, 100ng/ml IFN γ oder 100nM TPA zugesetzt. Für Western Blot, ChIP und ABCD beträgt die Inkubationszeit 30min, für Reporterassays 8h bei 37°C im Brutschrank.

4.3.5 Transiente Transfektion von HT-29 Zellen

Transfektion mittels Metafectene pro

Die verwendeten HT-29 Zellen werden mit Hilfe des kationischen Lipids Metafectene pro[®] transfiziert. Dazu werden 1×10^6 HT-29 Zellen in 6-Wellplatten bzw. 5×10^5 in 12-Wellplatten eingesät und bis zu einer Konfluenz von 80-90% bei 37°C im Brutschrank inkubiert (ca. 24h). Pro Ansatz mit 0,5 Mio Zellen werden jeweils 1 μ g Plasmid-Konstrukte eingesetzt. Dazu werden die DNA sowie 7 μ l Metafectene separat in 50 μ l serum- und antibiotikafreiem Medium verdünnt, anschließend vereint und 20min inkubiert. Währenddessen werden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit 1,5ml frischem Komplettmedium (ohne Antibiotika) versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgt die Zugabe von 0,5ml Komplettmedium (ohne Antibiotika) zum Transfektionsansatz, welcher dann komplett auf die Zellen gegeben wird. Die Inkubationszeit beträgt etwa 16h.

Werden die transfizierten Zellen im Rahmen eines Reporterassays benötigt, schließt sich das ebenfalls beschriebene Protokoll für Dual-Luciferase-Reporterassay an.

Transfektion mittels Nukleofektion

Diese Variante der Transfektion beruht auf der Elektroporation und ist ein von der Firma Lonza GmbH Köln entwickeltes Verfahren. Sie erfolgt in dem Nucleofector I[®] in einem, vom Hersteller entwickelten Medium. Die Einstellungen am Nukleofektionsgerät und die Wahl des Mediums kann bei diesem Protokoll für die jeweilige Zelllinie optimiert werden, wodurch hohe Transfektionseffizienzen bei hoher Zellvitalität erzielt werden können. In Vorversuchen wurde mit HT29-Zellen die beste Transfektionseffizienz mit dem Transfektionsreagenz V und dem Programm J30 erreicht.

Für jeden geplanten Transfektionsansatz zentrifugiert man bis zu 12 Mio Zellen ab und nimmt diese nach 2 Waschgängen mit PBS in 100 μ l Transfektionsreagenz V auf. Nach Zugabe von jeweils 3 μ g des zu transfizierenden Plasmids verteilt man die Ansätze auf die vom Hersteller bereitgestellten Elektroporationsküvetten. Es erfolgt die Transfektion in diesen Küvetten mit dem oben genannten Programm. Die transfizierten Zellen werden in 2,5ml RPMI-Medium gegeben.

Werden die transfizierten Zellen im Rahmen eines Reporterassays benötigt, schließt sich das anschließend beschriebene Protokoll Dual-Luciferase-Reporterassay an.

4.3.6 Dual-Luciferase-Reportergen-Assay

In dem Dualen Luciferase-Reportergen-Assay wird die Phorbol- und Cytokininduzierte Hochregulierung der Luciferaseexpression anhand der verwendeten Reportergenkonstrukte ermittelt.

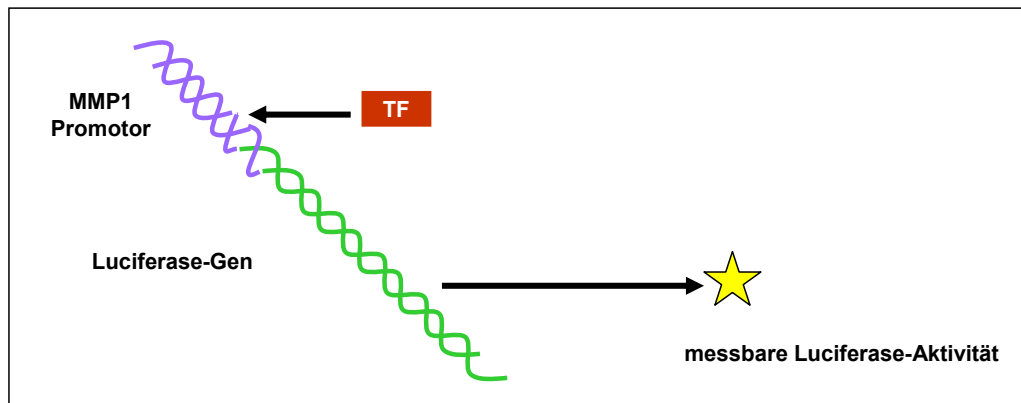


Abb. 8: Schematischer Ablauf eines Reportergenassays

Für die Nachweisreaktion des gebildeten Enzyms wird das 'Dual-Luciferase® Reporter (DLRTM) Assay System' der Firma Promega verwendet. Bei diesem System wird simultan die Expression zweier individueller Reporterenzyme innerhalb eines einzelnen Systems gemessen. Typischerweise ist das „experimentelle“ Reportergenkonstrukt an den Effekt spezifischer experimenteller Bedingungen gekoppelt, während die Aktivität des ko-transfizierten „Kontroll“-Reportergenkonstrukts eine Kontrolle bietet, die die Grundaktivität wiedergibt. Dadurch werden experimentelle Differenzen, die z. B. durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen herbeigeführt werden können, normiert. Bei dem „DLRTM-Assay“ wird die Aktivität der *Firefly*-(*Photinus pyralis*) und der *Renilla*-(*Renilla reniformis*) Luciferase sequentiell innerhalb derselben Probe gemessen. Zur Vorbereitung des Assays werden die Zellen zunächst abzentrifugiert, mehrfach mit PBS gewaschen und anschließend mit „Passive Lyse Buffer“ aufgeschlossen. Die Intensität der Lumineszenz (LU) der *Firefly*-Luciferase wird zuerst durch Zugabe des „Luciferase Assay Reagents II“ (LAR II) gemessen, um ein stabiles Lumineszenzsignal zu erhalten. Dies geschieht in einem Mikroplatten-Luminometer.

Danach wird die Reaktion durch Zugabe des „Stop & Glo“ Reagents in dasselbe Well gequencht (ausgelöscht) und die *Renilla*-Luciferase-Reaktion simultan initiiert. Im Anschluss kann die *Renilla*-Luciferaseaktivität gemessen werden. Dabei wandelt die exprimierte Luciferase (*Firefly*- oder *Renilla*-Luciferase) das vorliegende Luciferin in Oxyluciferin um, wodurch Licht entsteht. Die Intensität der Lumineszenz (LU) ist proportional zur exprimierten Luciferasemenge (Wood und de Wet, 1984) und kann nach Abschluss der Messung beider Luciferasekonstrukte quantifiziert werden, indem die Daten der *Firefly*-Luciferaseaktivität durch die Daten der *Renilla*-Luciferaseaktivität geteilt werden. Ein Vergleich der gemessenen Intensitäten liefert somit ein Maß für die Stimulierbarkeit eines

Reportergenkonstrukts durch die unterschiedlichen Cytokine. Als besondere Größe kann daraus der Stimulationsindex (SI) abgeleitet werden, der aus dem Verhältnis der resultierenden Lumineszenzen von stimulierten zu unstimulierten Zellen in Bezug auf ein bestimmtes Cytokin oder TPA gebildet wird.

4.3.7 Durchflusscytometrie

Bei der Durchflusscytometrie werden Zellen durch eine Kapillare in das Durchflusscytometer angesaugt und schließlich in einer isotonen Lösung so aufbereitet, dass sie hintereinander durch eine Fließkammer strömen und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigleiten. Das auftreffende Licht wird dabei in unterschiedliche Richtungen abgelenkt. Vorwärts gestreutes Licht („Forward Scatter“, FSC) gibt Auskunft über die relative Größe der Zelle, seitwärts gestreutes Licht („Side Scatter“, SSC) ist ein Maß für die Oberflächen-beschaffenheit/Granularität der Zelle.

Für den Nachweis der Fluoreszenz wurde das pEGFP-Plasmid verwendet, welches circa 12h zuvor transfiziert worden war. Die Zellen wurden durch mehrfaches Waschen mit PBS und FACS-Puffer auf die Messung vorbereitet. Für die anschließende Messung wurden die Zellen in 100µl FACS-Puffer aufgenommen.

Trifft eine fluoreszierende Zelle auf den Laserstrahl, so emittiert Fluoreszenzfarbstoff Licht größerer Wellenlänge. Streu- und Fluoreszenzlicht werden in einem getrennten System zu Photodetektoren geleitet, wo sie in Signale umgewandelt werden.

FACS-Puffer: 3% BSA (Pulver: Albumin Fraktion V) in PBS (1x)

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Zelllyse

Die Zelllyse dient der Extraktion der Zellproteine. Bei der Lyse findet entweder der NP-40 Lysepuffer oder der NetN Lysepuffer Anwendung. In beiden Fällen werden dem Lysepuffer Phosphatase- und Proteaseinhibitoren zugefügt, um den Abbau der Proteine durch Proteasen zu verhindern und nicht den aktuellen Phosphorylierungsstatus durch Dephosphorylierung zu verändern.

Zelllyse mit NP40

Diese Form der Zelllyse verwendet man, wenn das Zelllysate für SDS-PAGE eingesetzt wird. Die abzentrifugierten Zellpellets werden mit 10-15µl (je nach Größe des Pellets) des Lysepuffers versetzt und für 30min auf Eis inkubiert. Um im Kern enthaltene Proteine zu erhalten, werden die Zellkerne durch abwechselndes Bad in flüssigem Stickstoff und 37°C warmem Wasserbad zerstört. Anschließend werden die Zellfragmente bei 17xg und 8°C für 15min abzentrifugiert, der Überstand wird abgenommen.

Zelllyse mit NetN

Diese Form der Zelllyse verwendet man, wenn das Zelllysate für ABCD-Analysen eingesetzt wird. Hier werden die abzentrifugierten Zellpellets mit 100-300µl (je nach Größe des Pellets) des Lysepuffers versetzt. Danach erfolgt eine Ultraschall-Behandlung: 10s, Amplitude 40, Cycle 0,5. Auch so werden die im Kern enthaltenen Proteine freigesetzt. Anschließend werden die Zellfragmente bei 17xg und 8°C für 15min abzentrifugiert, der Überstand wird abgenommen.

4.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wird nach der Methode von Bradford (Bradford und Jones, 1975) durchgeführt. Zunächst erstellt man eine Eichkurve mit verschiedenen Verdünnungen einer Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung. Dazu wird 1ml Bradford-Reagenz 1:5 in Aqua dest. verdünnt und 2ml davon in einer Einwegküvette vorgelegt. Jeweils 2µl der zu untersuchenden Probe bzw. der jeweiligen Verdünnung des Standards werden hinzu pipettiert, gemischt und 5min bei RT inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgt bei 595nm an dem Gerät Spekol 1200.

Mit Hilfe der erhaltenen Extinktionswerte der einzelnen Standardkonzentrationen kann so eine Regressionsgerade ermittelt werden, anhand derer der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt wird.

4.4.3 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE, bei der Natriumdodecylsulfat (SDS) als Detergenz eingesetzt wird, um die Proteine zu denaturieren und negativ zu laden, erfolgt nach der Standardmethode (Lämmli, 1970). Es werden 8,4%ige Polyacrylamid-Gele verwendet, zur Auftrennung von sehr kleinen Proteinen wird die Konzentration von Acrylamid auf 12,5% erhöht. Die polymerisierten Gele werden in die Apparaturen von BioRad eingespannt, die Kammern mit 1x Elektrophoresepuffer, gefüllt und die Geltaschen mit einer Proteinmenge von 20µg beladen. Zuvor versetzt man die Probe 8-10µl 2x SDS-Probenpuffer und denaturiert die Proteine bei 95°C für 10min. Die Auftrennung der Proteine erfolgt für 20min bei 100V, 250mA (Sammelgel) und anschließend für 60-90min bei 180V, 500mA (Trenngel). Als Proteingrößenstandard wird der SDS-7B-Marker (Sigma) verwendet.

<i>Trenngelpuffer:</i>	<i>TRIS - HCl 2M, pH 8,0</i>
<i>Sammelgelpuffer:</i>	<i>TRIS - HCl 0,5M, pH 6,8</i>
<i>1x Elektrophoresepuffer:</i>	<i>10x: 2M Glycin, 0,25M Tris, 35mM SDS</i>
<i>SDS-Probenpuffer:</i>	<i>33,3% SDS-Lösung (20% SDS), 10% Tris-Lösung (1 M pH6,8), 33,3% Glycerol, 33,3% Mercaptoethanol, Spatelspitze Bromphenolblau</i>

4.4.4 Western Blot

Die zu detektierenden Proteine werden in vorangegangenen Schritt im Gel der Größe nach aufgetrennt und müssen nun auf eine Nitrocellulosemembran überführt werden, um sie mit einem spezifischen Antikörper zu detektieren. Zum Transfer nutzt man eine Blotapparatur der Firma Biorad, die mit 1x Transferpuffer gefüllt wird. Der Blotvorgang dauert bei 100V und 300mA je nach Größe der Zielproteine 90-120min.

Nach dem Blotten wird die Membran 15min in 1x Ponceau-Rot geschwenkt. Durch die auftretende Färbung konnte optisch kontrolliert werden, ob der Transfer erfolgreich war und überall die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde.

<i>Transferpuffer:</i>	<i>10,5 mM Tris, 202,6 mM Glycin, 20% Methanol; pH 7,5</i>
<i>Ponceau-Rot:</i>	<i>10x: 2,6 mM Ponceau S, 0,185 M Trichloressigsäure (TCA), 0,118 M Sulfosalicylsäure</i>

4.4.5 Immunodetektion

Nach dem Blotten wird die Membran mit Blockpuffer für 60min blockiert und danach 2 x 5min mit TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation der Membran mit in 1x TBS-T verdünntem primären Antikörper über Nacht bei 4°C. Nachdem die Antikörperlösung entfernt wurde, erfolgt durch fünfmaliges Waschen der Membran mit 1x TBS-T für je 10min die Entfernung von nicht gebundenem primären Antikörper. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem peroxidasegekoppelten sekundären Antikörper für 1h bei Raumtemperatur. Durch mehrmaliges Waschen (5x mit 1x TBS-T je 10min) sollte auch hier nicht gebundener, sekundärer Antikörper von der Membran entfernt werden. Zur Detektion wird die Membran mit 1ml ECL-Lösung für 1min benetzt, zwischen zwei Lagen Folie eingeschlagen und in eine Filmkassette zusammen mit dem Röntgenfilm für 1 bis 15min (je nach zu detektierendem Protein und genutzten 1. und 2. AK) gelegt. Nach der Entwicklung kann die Membran bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder gestrippt werden.

Blockpuffer: 1 x TBS, 0,1% Tween 20, 5% Magermilchpulver

TBS-T: 10x: 1,54 M NaCl; 1,3 M Tris; pH 7,5; 0,1% Tween 20 zu 1x TSB-T

4.4.6 Entfernung gebundener Antikörper von der Blotmembran (Strippen der Membran)

Die Membran wird mit 50ml Strippuffer in einem 50 ml-Röhrchen 40min bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Damit lassen sich alle primären und sekundären Antikörper von der Membran lösen. Nach einstündiger Blockierung der Membran mit 1x TBS-T-5% Milchpulver und mehrmaligem Waschen in 1x TBS-T kann die Membran für einen weiteren immunochemischen Nachweis verwendet werden.

Strippuffer: 32,8mM Tris, 35mM SDS, 0,78% Mercaptoethanol; pH 6,7

5 Ergebnisse

5.1 *In vitro* Untersuchungen zur Bindung von STAT3 und AP-1 an Bindungselemente in artifiziellen MMP-1-Promotorkonstrukten

5.1.1 Voruntersuchungen zum *in vitro* Protein-DNA-Bindungsassay

Auf den bisher bereits in der Einleitung beschriebenen Ergebnissen beruhend führten Tsareva *et al.* EMSA-Analysen durch, um zu untersuchen, ob STAT3 an den humanen MMP-1-Promotor binden kann. Zuvor konnten mit Hilfe des MEME Search Blast Algorithmus nach Bailey *et al.* (1994) in computergestützten Analysen sechs potentielle STAT3- Bindungsstellen auf dem humanen MMP-1-Promotor nachgewiesen werden, welche eine hohe Übereinstimmung mit der Konsensussequenz TTCNNGAA aufweisen. Diese wurden nach abnehmender Ähnlichkeit mit dieser Sequenz mit den Buchstaben A – F bezeichnet:

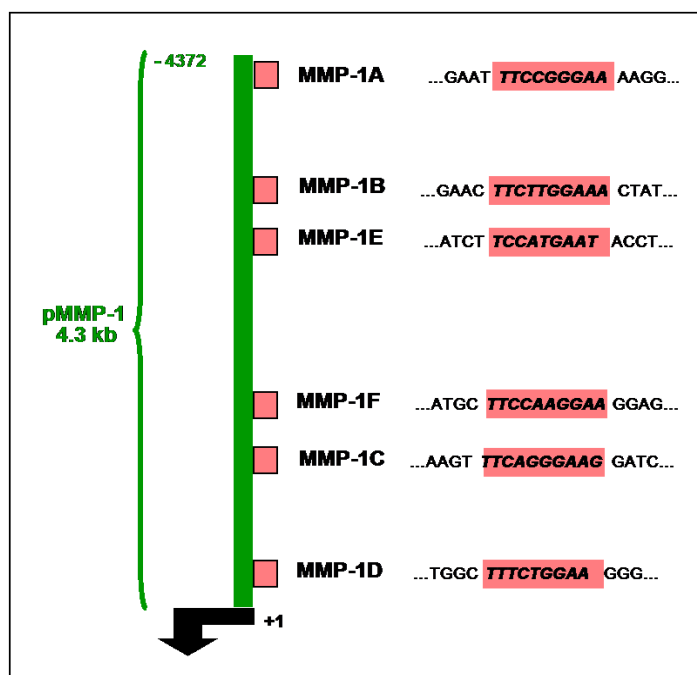


Abb. 9: Potentielle Bindungsstellen im MMP-1-Promotor mit hoher Affinität für phospho-STAT3. Der MMP-1-Promotor wurde ursprünglich von Rutter *et al.* 1998 festgelegt. n+1 entspricht dem Transkriptionsstart.

Nur an der Bindungsstelle „MMP-1A“ an Position -4372 konnte tatsächlich mit Hilfe dieses Assays eine STAT3-DNA-Bindung nachgewiesen und die STAT3-DNA-Komplexbildung durch einen *Supershift* mit einem spezifischen STAT3-Antikörper bestätigt werden. Die anderen fünf Bindestellen zeigten im EMSA keine klare Affinität zu diesem Transkriptionsfaktor (Tsareva *et al.*, 2007. Daten nicht gezeigt).

Aufbauend auf diesen bisherigen Erkenntnissen sollten nun die Bindungseigenschaften des Transkriptionsfaktors STAT3 weiter untersucht und sein Zusammenwirkungen mit AP-1 bei der Regulation des humanen MMP-1-Promotors beobachtet werden. Dazu wurde ein *in vitro* Protein-DNA-Bindungsassay eingesetzt, das eine Präzipitation von an DNA gebundene Proteine und ihre Charakterisierung mit Hilfe von Antikörpern ermöglicht: Das „ABCD“ (*Avidin Biotin Complex DNA*). Im Vergleich zum EMSA können potentiell mehrere Proteine bzw. Proteinkomplexe nachgewiesen werden.

Die erste Grundlage für ein ABCD bildet doppelsträngige DNA, die mit einem Biotinrest versehen wurde. Die artifiziellen Sense- und Antisense-DNA-Stränge lagern sich durch Erhitzen und anschließendes Erkalten aneinander (Annealing). Um zu überprüfen, ob doppelsträngige DNA entstanden ist, wurden Proben mit Sense-, Antisense- und potentiell hybridisierter DNA auf 20% Polyacrylamidgelen aufgetragen. Abbildung 10 zeigt am Beispiel von MMP1F, dass die einzelsträngigen Sense- und Antisense-DNA-Fragmente deutlich weiter als das hybridisierte Produkt laufen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es unter den gewählten Bedingungen zu einem Aneinanderlagern kommt.

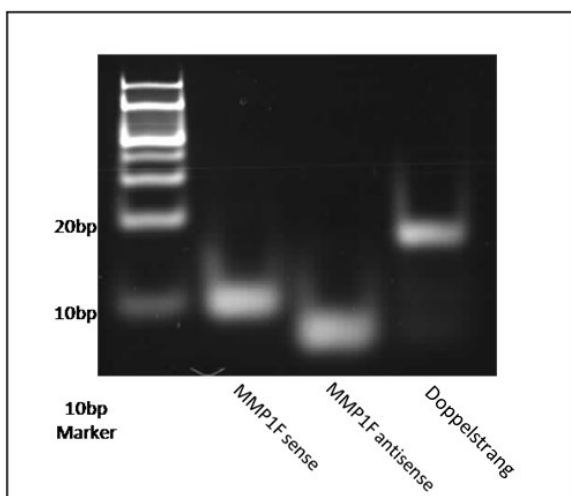


Abb. 10: 20% Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Ausbildung von DNA-Hybriden aus Oligonukleotiden

eingesetzte DNA: 50µg Probe

Details siehe Text sowie Material und Methoden

Die zweite Grundlage für das ABCD sind Zelllysate. Als Modellzelllinie wurde die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 verwendet. Sie besitzt kein aktives STAT3 oder AP-1, jedoch ist durch entsprechende Stimulation mit 100ng/ml IL-6 bzw. 100nM TPA eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren möglich (Corvinus *et al.*, 2005). Nach anschließender Zelllyse wurden DNA und Zelllysate zusammen gegeben. Fragestellung hier war, ob sich die durch Stimulation aktivierten Transkriptionsfaktoren an entsprechende Bindungsstellen der DNA anlagern. Hinzugegebenes Heringssperma sättigte unspezifische Bindungsstellen ab. Als Positivkontrolle diente die MMP-1A-

Bindungsstelle, da sie sich im EMSA bereits als positive Bindungseinheit für STAT3 erwiesen hatte (Tsareva *et al.*, 2007). Ein GRE (*Glucocorticoid Response Element*)-Oligonukleotid wurde als Negativkontrolle verwendet, da weder STAT-Proteine noch AP-1 daran binden können (Krämer *et al.*, 2009).

Das sich anschließende Prozedere ist ausführlich in Material und Methoden beschrieben.

Eine Etablierung des Verfahrens für die hier verwendeten Zelllysate und DNA-Fragmente erfolgte gemeinsam mit Annekatrin Müller.

5.1.2 Analyse der Bindung von STAT3 an STAT3-Bindungselemente des MMP-1-Promotors

Mit Hilfe des ABCD sollte nun festgestellt werden, ob der Transkriptionsfaktor STAT3 an die verschiedenen Bindungsstellen des MMP-1-Promotors binden kann.

Dazu wurden ABCDs unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt: Zum einen wurden Lysate von Zellen verwendet, die zuvor nicht stimuliert worden waren. STAT3 liegt also nicht aktiviert vor. Zum anderen wurden lysierte Zellen eingesetzt, die vorab mit IL-6 stimuliert worden waren. Die Anlagerung von IL-6 an die entsprechenden Rezeptoren führt zur Phosphorylierung der STAT3-Proteine an der Position Y705 und damit zur Aktivierung durch Dimerbildung. Die entstandenen Dimere haben alle Voraussetzungen, um in den Zellkern zu translozieren und sich dort an spezifische Bindungsstellen der DNA zu lagern.

Neben den verschiedenen Zelllysaten wurden unterschiedliche artifizielle DNA-Fragmente verwendet. Jede potentielle STAT3-Bindungsstelle wurde als Oligonukleotid-Hybrid in das ABCD eingebracht:

Probenansatz	Zelllysatz	DNA- Fragment	Zelllysatz	DNA- Fragment
1	unstimuliert	MMP1A	IL-6 stimuliert	MMP1A
2	unstimuliert	MMP1B	IL-6 stimuliert	MMP1B
3	unstimuliert	MMP1C	IL-6 stimuliert	MMP1C
4	unstimuliert	MMP1D	IL-6 stimuliert	MMP1D
5	unstimuliert	MMP1E	IL-6 stimuliert	MMP1E
6	unstimuliert	MMP1F	IL-6 stimuliert	MMP1F

Die Inkubation mit Streptavidin-Agarose-Beads erfolgte bei jeder Probe in gleicher Weise. Die entstandenen Komplexe aus Proteinen, artifizieller DNA und Beads wurden nach mehreren Waschschritten durch Aufkochen bei 95°C mit 2x Lämmli-Puffer wieder gelöst und die Protein-Proben wurden durch SDS-PAGE und Western Blot elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt

und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Zum Nachweis der STAT3-Phosphorylierung wurde die Membran mit einem spezifischen Antikörper gegen Tyrosin-705-phosphoryliertem-STAT3 inkubiert. Nach Behandlung mit sekundärem Goat-Anti-Rabbit-Antikörper erfolgte die Detektion. Die Ergebnisse der ABCDs sind in den Abbildungen 11 und 12 gezeigt:

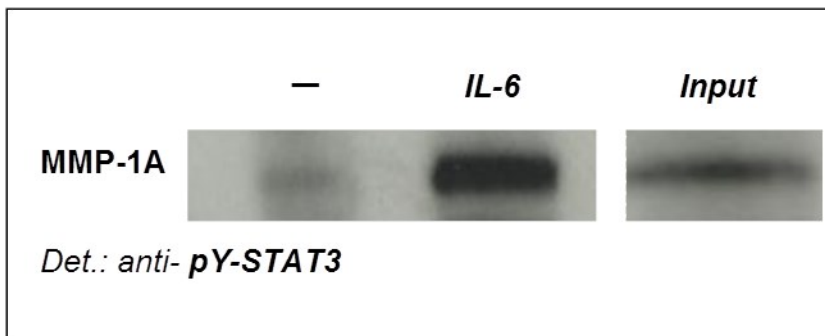


Abb. 11: stimulationsabhängige Interaktion von STAT3 mit dem STAT3-Bindungselement „MMP-1A“

Phospho-STAT3 (zuvor mit IL-6 stimuliert) aus Zelllysaten wurde im ABCD und darauffolgend SDS-PAGE und Western Blot getestet, ob es an die entsprechende Bindungsstelle im artifiziellen MMP1-Promotorfragment bindet. Positivkontrolle: MMP1A. Negativkontrolle: GRE. Input: 10% des für die Präzipitation eingesetzten Zelllysats.

Abbildung 11 zeigt, dass nach Stimulation mit IL-6 aktiviertes, phosphoryliertes STAT3 an das MMP-1A-Promotorfragment binden kann und bestätigt somit die EMSA-Ergebnisse von Tsareva *et al.*, 2007. Bei den unstimulierten Zellen ist STAT3 nicht aktiviert und kann so nicht an die DNA binden.

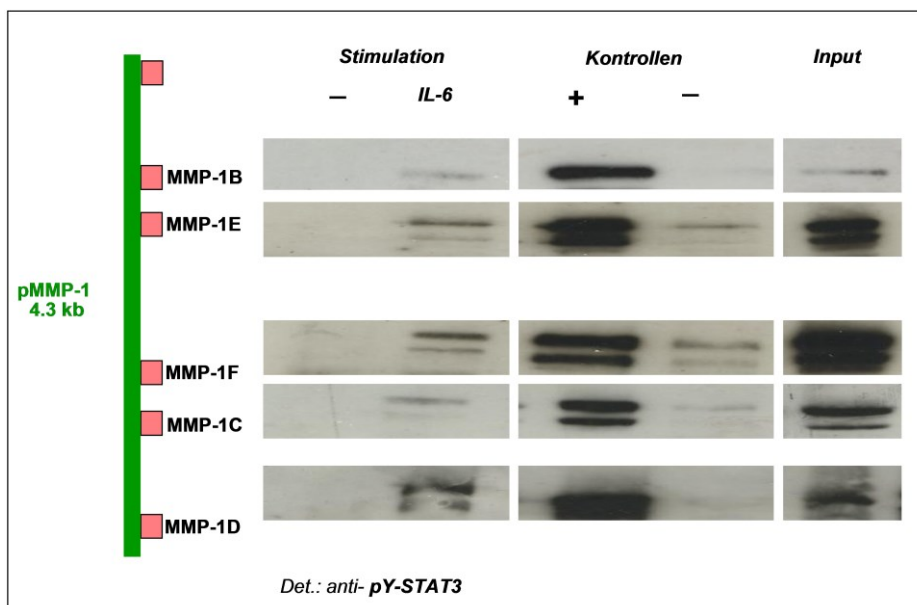


Abb. 12: Stimationsabhängige Interaktion von STAT3 mit den potentiellen STAT3-Bindungselementen des MMP1-Promotors

Details siehe Abbildung 11

Abbildung 12 zeigt die ABCD-Ergebnisse der restlichen fünf STAT3-Bindungselemente des MMP-1-Promotors. Auch hier liegt kein aktives STAT3 in unstimulierten Zellen vor, welches an die DNA-Fragmente binden kann. Sind die Zellen allerdings mit IL-6 stimuliert, scheint aktiviertes STAT3 an die entsprechenden DNA-Fragmente zu binden.

Im Gegensatz zu den EMSA-Ergebnissen von Tsareva *et al.* zeigt das ABCD also bei jedem DNA-Fragment Signale, was bedeuten würde, dass phospho-STAT3 an jede der potentiellen Bindungsstellen binden kann. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass im ABCD mehr Protein aus lysierten Zellen eingesetzt wird, also vielleicht so schwächere Bindungen als im EMSA nachgewiesen werden können.

5.1.3 Analyse der Bindungsverhältnisse von STAT3 und AP-1 an Bindestellen im MMP-1-Promotor

Nicht nur die sechs von Svetlana Tsareva aufgezeigten potentiellen STAT3-Bindestellen erwiesen sich auf diesem 4,3kb umfassenden DNA-Strang als interessant. Eng benachbart zur MMP-1D-Bindungsstelle befindet sich eine Bindungseinheit für AP-1. Frühere Deletionsversuche der Arbeitsgruppe haben ergeben, dass ein 0,6kb-Fragment mit der MMP-1D- und der AP-1-Bindungseinheit über 30% der initialen konstitutiven Promotoraktivität im Verhältnis zum gesamten 4,3kb-Fragment ausmachen (Zugowski *et al.*, 2011).

Da die ABCD-Versuche von Annekatriin Müller relevant für die folgenden Versuche in dieser Arbeit sind, werden ihre Ergebnisse in Abbildung 13 dargestellt.

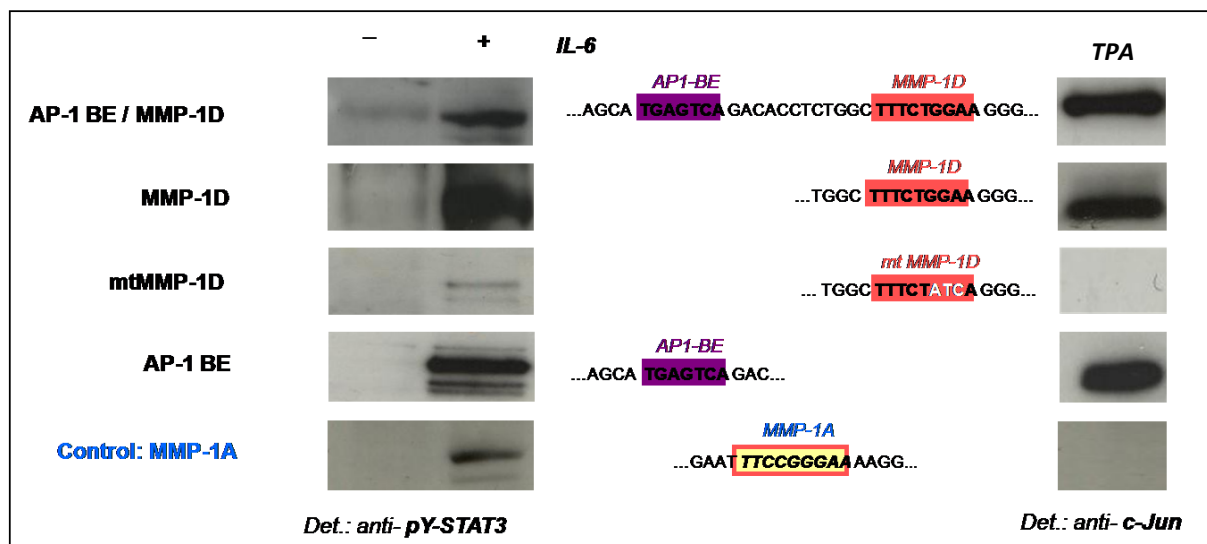


Abb. 13: Stimulationsabhängige Interaktion von STAT3 und AP-1 mit dem STAT3- und dem AP-1-Bindungsselement des MMP1-Promotors (Dissertation Annekatriin Müller)

Phospho-STAT3 (zuvor IL-6-stimuliert) und c-jun (zuvor TPA-stimuliert) aus Zelllysaten wurden im ABCD und darauffolgend SDS-PAGE und Western Blot getestet, ob sie an entsprechende Bindestelle im artifiziiellen MMP-Promotor-Fragment binden.

Ihre Daten zeigen, dass phospho-STAT3 sowohl an ein Konstrukt bestehend aus der MMP-1D-Bindungsstelle und der AP-1-Bindungseinheit bindet als auch an einen DNA-Strang, der nur die MMP-1D-Bindungseinheit enthält. Ist die MMP-1D-Bindungsstelle mutiert, kann phospho-STAT3, wie erwartet, nicht binden. Auf der anderen Seite ist zu erkennen, dass AP-1 ebenfalls an das Konstrukt mit MMP-1D- und AP-1-Bindungsstelle und auch an das Einzelkonstrukt, dass nur die AP-1-Bindungsstelle enthält, binden kann. Interessant ist, dass AP-1-Bindung aber auch am isolierten MMP-1D-Konstrukt nachzuweisen ist, genauso wie umgekehrt phospho-STAT3 an der AP-1-Bindungseinheit.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die individuellen Transkriptionsfaktoren Komplexe bilden und in dieser kooperativen Interaktion an die einzelnen Bindungsstellen binden können.

5.2 *In vivo* Untersuchung zur Bindung von STAT3 und AP-1 an MMP-1 Promotorfragmente

5.2.1 Voruntersuchung zur Chromatin-Immunopräzipitation

Bereits durch EMSA und ABCD war die Bindungsfähigkeit von STAT3 und AP-1 an Bindungselemente im MMP-1-Promotor-Basisfragment untersucht worden. Ein Vergleich dieser Verfahren lieferte kein völlig konsistentes Bild. Um die Situation an lebenden Zellen genauer zu untersuchen, folgte nun ein *in vivo* Experiment: Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP). Sie weist unter definierten Bedingungen die tatsächliche Bindung von Transkriptionsfaktoren an definierte DNA-Elemente im Chromatin lebender Zellen nach.

5.2.2 Analyse der Bindung von STAT3 und AP-1 an native DNA

Ziel der folgenden Experimente war die Überprüfung der Interaktion der Transkriptionsfaktoren STAT3 und AP-1 mit entsprechenden Bindungsstellen im Bereich MMP- 1D des MMP-1-Promotors im Kontext des nukleären Chromatins. Dazu erfolgte die Stimulation der Zellen zum einen mit IL-6 und zum anderen mit TPA, um STAT3 bzw. AP-1 intrazellulär zu aktivieren. Die stimulierten Zellen wurden nach Fixierung mit Formaldehyd, Zelllyse und Ultraschall-Behandlung mit Anti-phospho-STAT3 bzw. Anti-c-Jun über Nacht inkubiert (siehe Material und Methoden). Die Antikörper binden an die jeweiligen Transkriptionsfaktoren, die im Zelllysate vorliegen bzw. an die DNA gebunden sind. Danach können sich durch die hinzugegebenen Beads Komplexe bilden, die aus DNA mit gebundenen Transkriptionsfaktoren, daran angelagertem Antikörper und Beads bestehen. Durch mehrere Waschschrte werden diese Komplexe von nicht gebundener DNA im Zelllysate separiert. Um letztendlich die PCR durchführen zu können, werden die Komplexbindungen und auch die Transkriptionsfaktoren und Antikörper durch Proteinase K aufgelöst. Zusätzlich erfolgt die Zugabe von RNase, um eventuell vorhandene RNA zu zerstören. So lag schließlich nach einer sich anschließenden Phenol-Chloroform-Fällung die mit Antikörper über Transkriptionsfaktoren isolierte DNA vor, die nun in der PCR eingesetzt werden konnte.

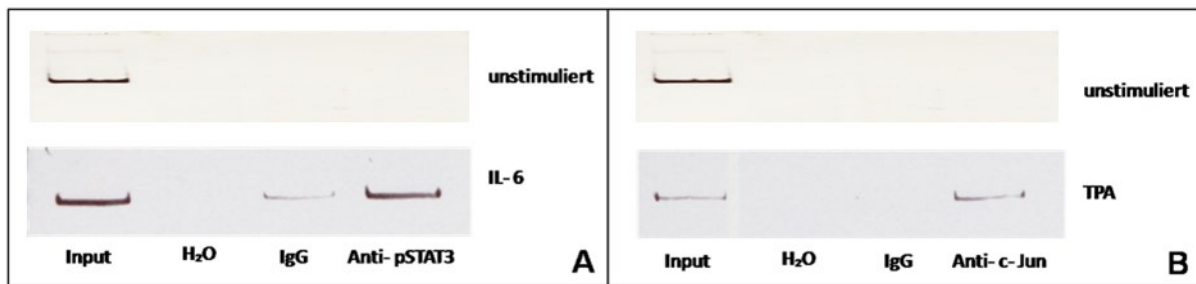


Abb. 14: Analyse der *in vivo*-Bindungen von STAT3 und AP-1 an Bindungsstellen im MMP-1-Promotor durch ChIP

Nach erfolgter Stimulation der HT-29-Zellen mit 10µl IL-6 bzw. TPA (30min), Fixierung mit Formaldehyd, Zellyse und anschließender DNA-Fragmentierung durch Ultraschall wurde zum entstandenen Zelllysat der Antikörper (Anti-c-Jun bzw. Anti-phospho-STAT3) gegeben. Nach anschließender Separierung der DNA-Transkriptionsfaktor-Antikörper-Komplexe mittels gebundenen Beads folgte die DNA-Isolierung mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Fällung und schließlich eine PCR-Amplifikation (siehe Material und Methoden).

Als Negativkontrolle wurde Anti-IgG eingesetzt, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Unbehandeltes Zelllysat, in dem durch Ultraschall-Behandlung und Phenol-Chloroform-DNA-Isolierung die DNA für die PCR präpariert worden war, diente als Positivkontrolle.

Die in PCR eingesetzten Primer weisen letztendlich ein 257bp langes Konstrukt nach, welches die MMP-1D-STAT3-Bindungsstelle und die benachbarte AP-1-Bindungseinheit enthält. Als Negativkontrolle für die PCR wurde H₂O mitgeführt.

Im Lysat von Zellen, welches weder mit IL-6 noch mit TPA stimuliert worden war, ließ sich keine induzierte Transkriptionsfaktor-Bindung an das Chromatin nachweisen.

Durch Stimulation mit IL-6 wird STAT3 über Januskinasen phosphoryliert, wodurch wiederum eine Dimer-Bildung möglich ist. Diese Dimere können die Kernmembran durchqueren und im Nukleus schließlich an die DNA binden. Abbildung 14a zeigt, dass aktiviertes STAT3 an das MMP-1D-Segment im MMP-1-Promotor binden kann, der eine STAT3-Bindungsstelle eng benachbart zu einer AP-1-Bindungseinheit enthält.

Werden Zellen mit TPA stimuliert, lagern sich, beispielsweise aktiviert über den MAP-Kinase-Signalweg, Proteine wie aus AP-1-Familie zusammen. Die Dimere bilden *Activated Protein 1*, welches in den Nukleus translozieren und sich ebenfalls an die DNA anlagern kann. Abbildung 14b beweist, dass c-Jun als UE von AP-1, wie auch STAT3, an das durch PCR nachgewiesene 257bp lange DNA-Fragment binden kann, was die AP-1 Bindungsstelle auf dem MMP-1-Promotor enthält.

Ein Kontrolllexperiment ohne spezifischen Antikörper gegen Transkriptionsfaktoren führte nicht zur Präzipitation des zu amplifizierenden DNA-Fragments.

Unspezifische Bindungen durch IgG in Abwesenheit spezifischer Antikörper gegen Transkriptionsfaktoren führten in allen Fällen zu geringeren Signalen.

Durch das ChIP-Verfahren wurde also gezeigt, dass sowohl aktiviertes STAT3 als auch AP-1 an einen DNA-Abschnitt im MMP-1-Promotor binden kann, der eine STAT3-Bindungsstelle und auch eine AP-1-Bindungseinheit enthält. So sind die Ergebnisse des ABCD-Verfahrens verifiziert. Damit ist gezeigt, dass die in Isolierung mögliche Bindung tatsächlich auch im Kontext der lebenden Zelle stattfindet.

5.3 Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität des MMP-1-Promotors in Reporter-genkonstrukten

5.3.1 Voruntersuchungen zur transienten Transfektion von HT-29-Zellen mit Reporter-genkonstrukten

Nachdem die prinzipielle Bindungsfähigkeit der Transkriptionsfaktoren AP-1 und STAT3 an spezifische Bindungselemente innerhalb des MMP-1-Promotors nachgewiesen wurde, sollte nun der Einfluss dieser Bindungen auf die transkriptionelle Aktivierung mittels dualen Luciferase-Reporter-gen-Assays genauer analysiert werden.

Vorab musste die effiziente transiente Transfektion von HT-29-Zellen mit Reporter-genkonstrukten standardisiert werden. Die Etablierung des Verfahrens erfolgte gemeinsam mit Nadine Knutti.

Die Transfektion wurde mit Hilfe der Nukleofektion® durchgeführt. Dabei werden Zellen mittels elektrischer Spannung permeabilisiert, sodass ein hinzugegebenes Plasmid in das Zellinnere gelangen kann. Die Zellmembran schließt sich wieder und die aufgenommene DNA kann transkribiert und translatiert werden.

Zunächst wurden mit Hilfe des Plasmids pEGFP (kodierend für „enhanced“ GFP) Programme und Medien für den Transfektionsansatz optimiert. pEGFP dient häufig als Transfektionsmarker. Dem Transfektionsansatz zugegeben ist bei erfolgreicher Aufnahme ins Zellinnere unter dem Fluoreszenzmikroskop eine grüne Fluoreszenz erkennbar. Damit lassen sich Aussagen über die Effektivität einer Transfektion anhand des Anteils der fluoreszierenden Zellen machen. Eine genauere Bestimmung ist durch cytometrische Fluoreszenzmessung möglich.

Dabei erwies sich Programm J30 des Nukleofektors I® mit Transfektionslösung V als beste Lösung, da unter diesen Bedingungen die maximale Transfektionseffizienz bei erhaltener Zellintegrität erreicht wurde.

Abbildung 15 dokumentiert eine zytometrische Messung von transfizierten HT-29-Zellen. Unter den oben beschriebenen Bedingungen zeigen im Vergleich zu dem untransfizierten Zellansatz 50% des transfizierten Zellansatzes ein Fluoreszenzsignal.

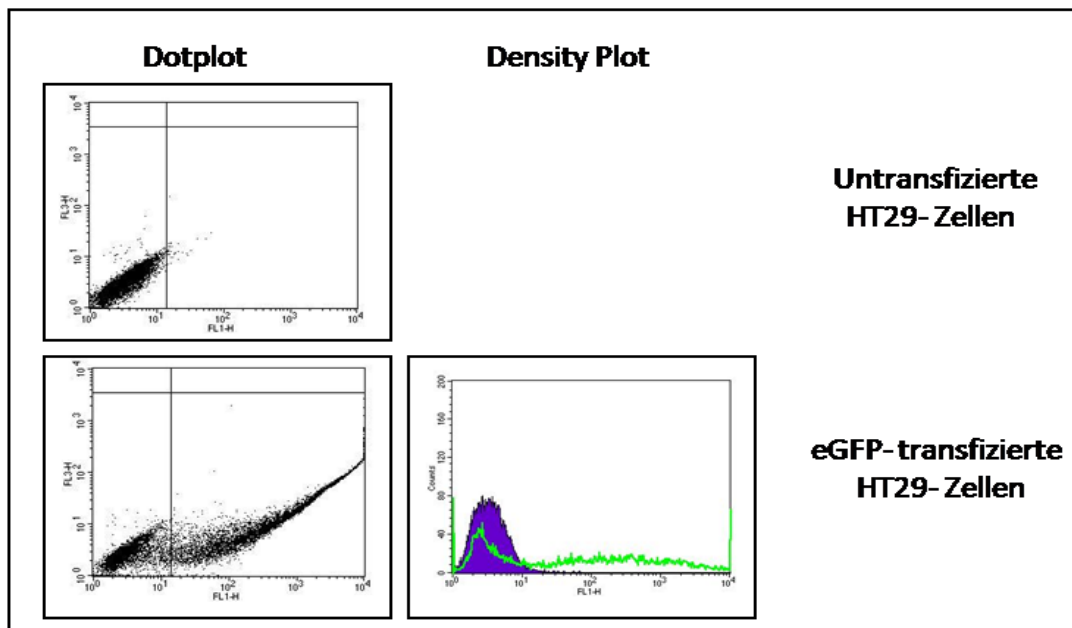


Abb. 15: Zytometrische Überprüfung der Transfektionseffizienz bei HT29-Zellen

HT29-Zellen wurden transient durch Elektroporation (Programm J30) mit eGFP transfiziert (jeweils 3µg Plasmid-DNA pro 1Mio Zellen). Nach 12h Inkubation wurden die Zellen mehreren Waschschritten mit FACS-Puffer (3% BSA in 1X PBS) unterzogen.

Als Vergleich dienten untransfizierte Zellen.

Dotplot: Darstellung der Parameter Forward Scatter (FSC) gegen SmE Scatter (SSC).

Density Plot: Darstellung der Fluoreszenz 2 (FL2-H) gegen die Fluoreszenz 1 (FL1-H).

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden mit den hier ermittelten Parametern durchgeführt.

Schließlich musste noch der Einfluss der Zellzahl auf die Transfektionseffizienz untersucht werden, da die geplanten Versuche bis zu 12Mio Zellen pro Transfektionsansatz benötigten. So wurden parallel 1Mio und 10Mio HT-29-Zellen unter gleichen Bedingungen mit dem Plasmid pEGFP transfiziert. Wie Abbildung 16 zeigt, ergab die darauffolgende FACS-Analyse für beide eine annähernd gleiche Transfektionseffizienz (1Mio- 37%, 10Mio-35%).

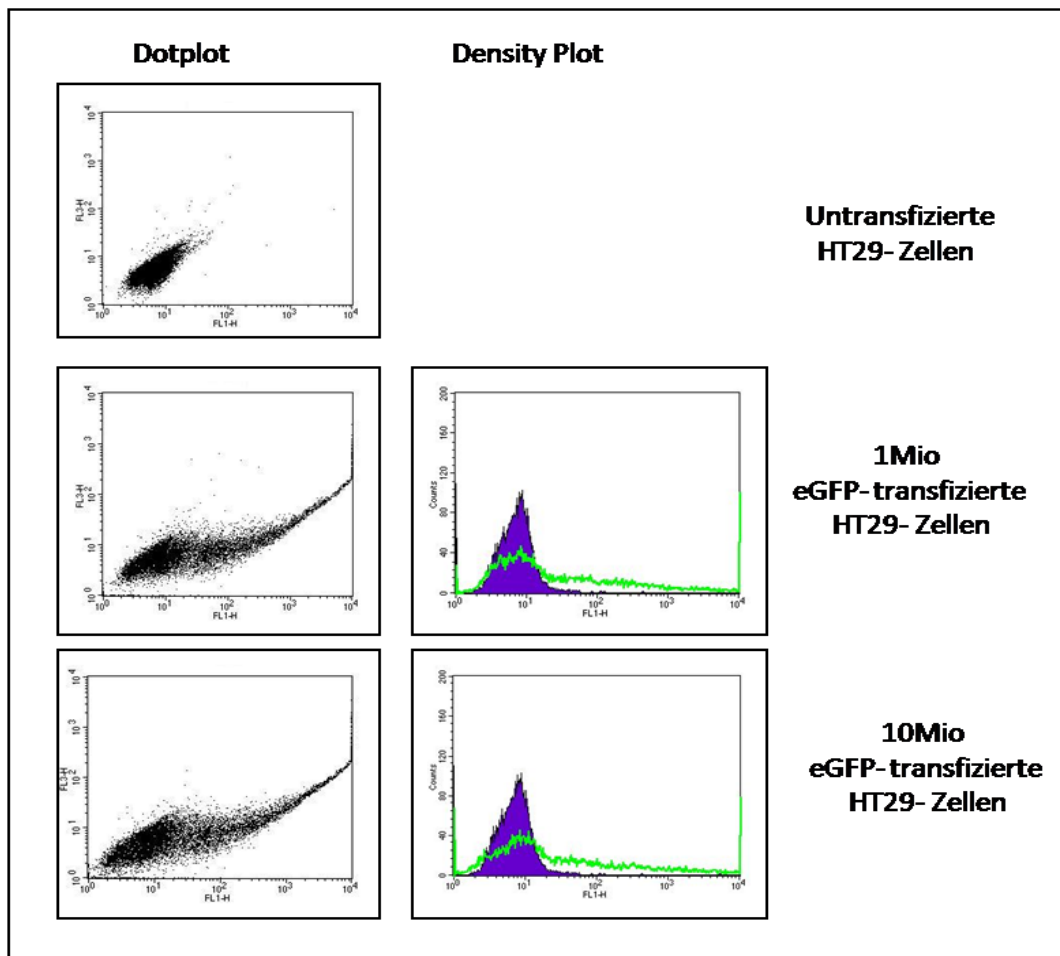


Abb. 16: Untersuchung des Einflusses der Zellzahl auf die Transfektionseffizienz bei HT29-Zellen

HT29-Zellen wurden transient durch Elektroporation (Programm J30) mit eGFP transfiziert (3µg bei 1Mio Zellen, 10µg bei 10Mio Zellen). Die Zellen wurden mehreren Waschschritten mit FACS-Puffer (3% BSA in 1X PBS) unterzogen. Als Vergleich dienten untransfizierte Zellen.

Dotplot: Darstellung der Parameter Forward Scatter (FSC) gegen SmE Scatter (SSC).

Density Plot: Darstellung der Fluoreszenz 2 (FL2-H) gegen die Fluoreszenz 1 (FL1-H).

Damit konnte nachgewiesen werden, dass mit Hilfe der Elektroporation eine ausreichend große Zahl von Zellen effizient transfiziert werden kann um genügend Material für mehrere folgende Parallelexperimente zu gewinnen.

Um den Einfluss der Transkriptionsfaktoren STAT3 und AP-1 auf die transkriptionelle Aktivierung einzeln untersuchen zu können, wurde das Minimalfragment des MMP-1-Promotors „0,6kb“ (pMMP-1-0,6) verwendet, welches bereits von Tsareva *et al.*, 2007 benutzt worden war. Zusätzlich wurden Mutationsvarianten eingesetzt, die Franziska Lieder im Rahmen ihrer Diplomarbeit 2006 hergestellt hatte. Es entstanden Konstrukte, bei denen in der STAT3-Bindungsstelle MMP-1D, in der AP1-Bindungsstelle oder in beiden gleichzeitig wenige Nukleotide ausgetauscht und damit die Bindungsstellen zerstört worden waren (siehe Abbildung 17). Dies erlaubt eine separate Beobachtung der Beiträge von STAT3 und AP-1 auf die Transkription.

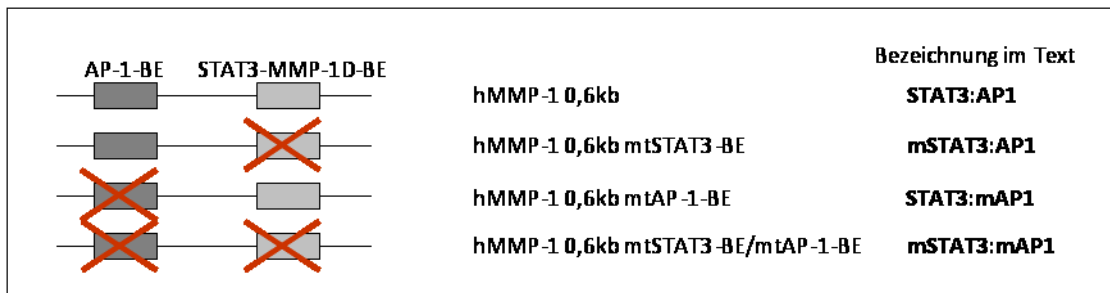


Abb. 17: Mutationsvarianten des Promotors hMMP-1 0,6kb (nach Franziska Lieder). Zum besseren Überblick werden im Folgenden die vereinfachten Bezeichnungen verwendet.

Die Promotorkonstrukte wurden, wie oben beschrieben, mittels Nukleofektion® transient in HT-29-Zellen transfiziert. Die Stimulation erfolgte durch IL-6 und/oder TPA zur Aktivierung von STAT3 bzw. AP-1. Zum Vergleich wurde mit Interferon- γ stimuliert, was sich unter anderem auf die Aktivierung von STAT1 auswirkt.

Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt und aus den erhaltenen Werten der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt. Die Messergebnisse wurden mit Hilfe des gepaarten T-Testes auf Signifikanz getestet. Es wurde stets eine Normalverteilung der Werte angenommen.

5.3.2 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität eines Minimalfragments des MMP-1-Promotors „0,6kb“ durch STAT3 und AP-1

Als Ausgang wurde zunächst das vollständig unmutierte Konstrukt (STAT3:AP1) in Zellen eingebracht. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 18:

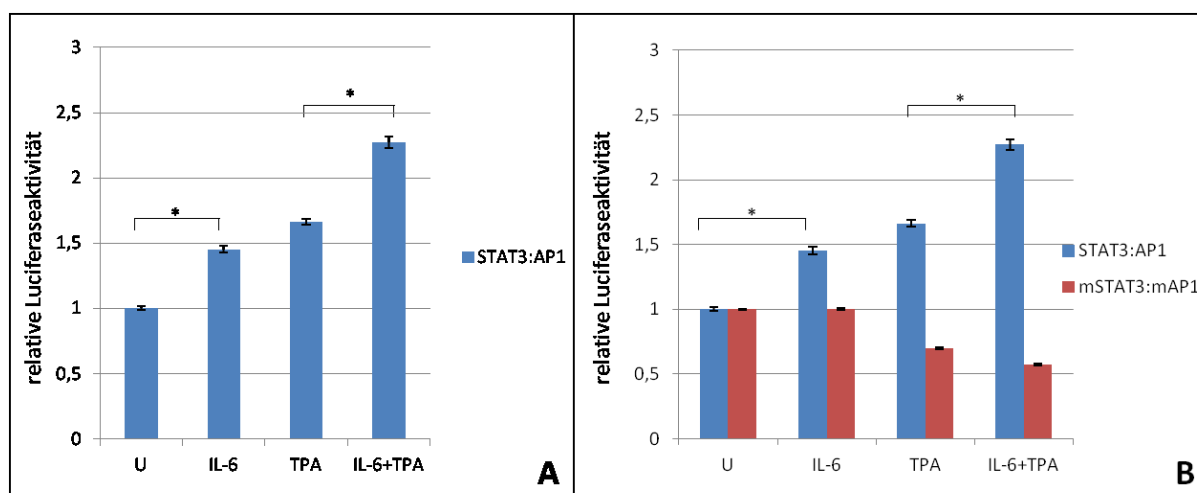


Abb. 18: Analyse der faktorabhängigen Reporterogenaktivitäten von MMP-1-Promotor. Zellen wurden transient mit „STAT3:AP1“-Konstrukt (3µg pro 1Mio Zellen) transfiziert. Nach ca. 15h Inkubation wurden STAT3 und AP-1 mit jeweils 100ng/ml IL-6 bzw. 100nM TPA aktiviert und anschließend die Reporterogenaktivitäten gemessen. Der Referenzwert der Luciferase-Aktivität (unstimulierte Zellen) wurde auf 1 festgelegt, die Vergleichswerte sind auf diesen Wert bezogen. Zum Vergleich werden die Ergebnisse der Zellen, transfiziert mit dem Promotor „mSTAT3:mAP1“ dargestellt. *P ≤ 0,05.

Die Transkriptionsaktivität bei Stimulation mit IL-6 bzw. TPA ist im Vergleich zu unstimulierten Zellen (U) um die Faktoren 1,4 bzw. 1,6 erhöht (A). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es sowohl bei der Bindung von aktiviertem STAT3 als auch bei der Bindung von AP-1 zu einer erhöhten Transkription kommt. Wird IL-6 gemeinsam mit TPA als Stimulans eingesetzt, ist ein klarer additiver Effekt mit einem Faktor von 2,3 erkennbar, was bedeuten könnte, dass aktiviertes STAT3 mit AP-1 als Komplex gebunden oder beide Transkriptionsfaktoren individuell gemeinsam eine höhere Transkriptionsaktivität bedingen.

Als Negativkontrolle sind auch die Ergebnisse von Reportergenversuchen mit mSTAT3:mAP1 gezeigt (B). Durch diese Mutationen kann sich weder aktiviertes STAT3 noch AP-1 an die Bindungsstellen anlagern, eine transkriptionelle Aktivierung findet bei keiner der Proben statt.

5.3.3 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität eines Minimalfragments „0,6kb“ durch STAT3 und AP-1 nach spezifischem Ausschalten individueller Bindungsstellen

Daraufhin dienten die mutierten Konstrukte der weiteren Analyse. Zunächst wurden die Zellen mit dem Konstrukt, welches eine Mutation in der Bindungsstelle für STAT3 enthält, transfiziert (mSTAT3:AP1). Die Ergebnisse des Reporterassays zeigt Abbildung 19/rote Balken.

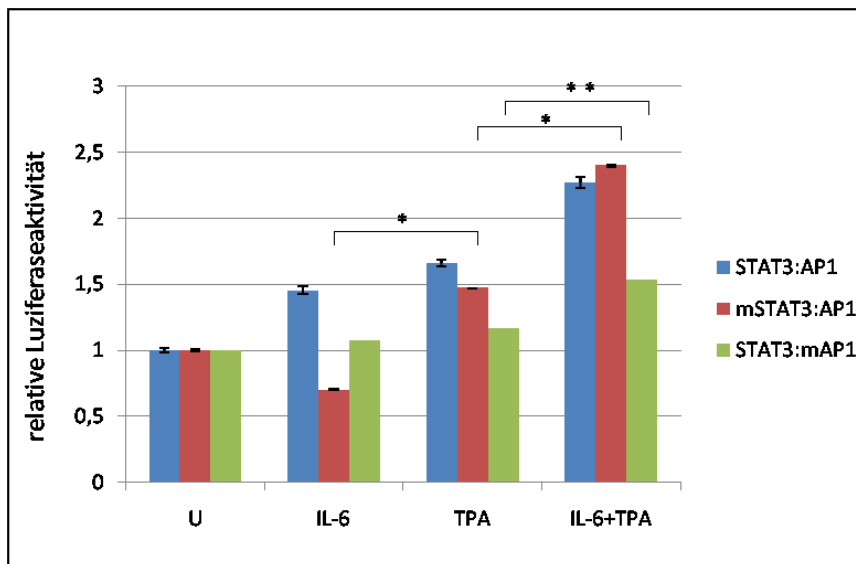


Abb. 19: Analyse der faktorabhängigen Reporteraktivitäten von MMP-1-Promotor-Konstrukten mit mutierten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

Zellen wurden transient mit dem „mSTAT3:AP1“-Konstrukt (3µg pro 1Mio Zellen) bzw. „STAT3:mAP1“-Konstrukt (3µg pro 1Mio Zellen) transfiziert. Nach ca. 15h Inkubation wurden STAT3 und AP-1 mit jeweils 100ng/ml IL-6 bzw. 100nM TPA aktiviert und anschließend die Reporteraktivitäten gemessen. Der Referenzwert der Luciferase-Aktivität (unstimulierte Zellen) wurde auf 1 festgelegt, die Vergleichswerte sind auf diesen Wert bezogen. Die Standardabweichungen sind zum Teil so klein, dass die graphisch nicht umgesetzt werden konnten. Zum Vergleich werden die Ergebnisse der Zellen, transfiziert dem mit unmutiertem Promotor „STAT3:AP1“ dargestellt. *P < 0,05; **P < 0,01

Durch die Mutation an der STAT3-Bindungsstelle wird verhindert, dass aktiviertes STAT3 an die DNA binden kann. Wie erwartet schaltet die Mutation die Stimulierbarkeit aus. AP-1 kann nach TPA-Stimulation weiterhin an das „0,6kb“-Konstrukt binden - die Stimulationsfähigkeit verändert sich kaum. Besonders auffällig ist das Ergebnis für die gemeinsame Stimulation von IL-6 und TPA: Die transkriptionelle Aktivierung bleibt gleich.

Abbildung 19/grüne Balken zeigen die Ergebnisse der Versuchsreihe mit dem Konstrukt, welches eine mutierte AP-1-Bindungsstelle und eine unmutierte STAT3-Bindungseinheit beinhaltet (STAT3:mAP1). Die Mutation verhindert die Bindung von AP-1 an die AP-1-Bindungsstelle. Die TPA-Stimulierbarkeit wird aufgehoben. Währenddessen hält die IL-6 Stimulationsfähigkeit im Vergleich zu STAT3:AP1 ein Level. Einen deutlichen Unterschied gibt es bei der Stimulation von TPA gemeinsam mit IL-6. Signifikant sinkt die transkriptionelle Aktivierung hier um den Stimulationsfaktor 0,8.

Ein Erklärungsansatz für diese Beobachtungen wäre, dass die Komplexe, bestehend aus aktiviertem STAT3 und AP-1, zum größten Teil über die Bindung an die AP-1 Bindungsstelle eine Transkriptionsaktivität auslösen. Die STAT3-Bindungsstelle wäre in diesem Fall von sekundärer Bedeutung.

5.3.4 Untersuchung der transkriptionellen Aktivität eines Minimalfragments „0,6 kb“ durch IFN

Wie mehrere Ansätze bisher gezeigt haben, existiert nicht nur für STAT3, sondern auch für einen strukturell nahen Verwandeten, STAT1, eine Bindungsstelle an c-Jun. Allerdings konnte bisher nie ein Effekt von STAT1 *in vivo* nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 1999; Ginsberg *et al.*, 2007).

Eine spezifische DNA-Bindungsstelle für STAT1 im MMP-1-Promotor existiert nicht, sodass eine Transkriptionssteigerung durch die Stimulation mit IFN- γ als Aktivator von STAT1 die Vermutung zulassen würde, dass eine Bindung an c-Jun und die Bindung an die DNA als Komplex existiert.

Folgende Experimente beschäftigen sich mit dieser Problematik.

Als Ausgang wurde zunächst das wildtypische Konstrukt (STAT3:AP1) in Zellen eingebracht. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 20:

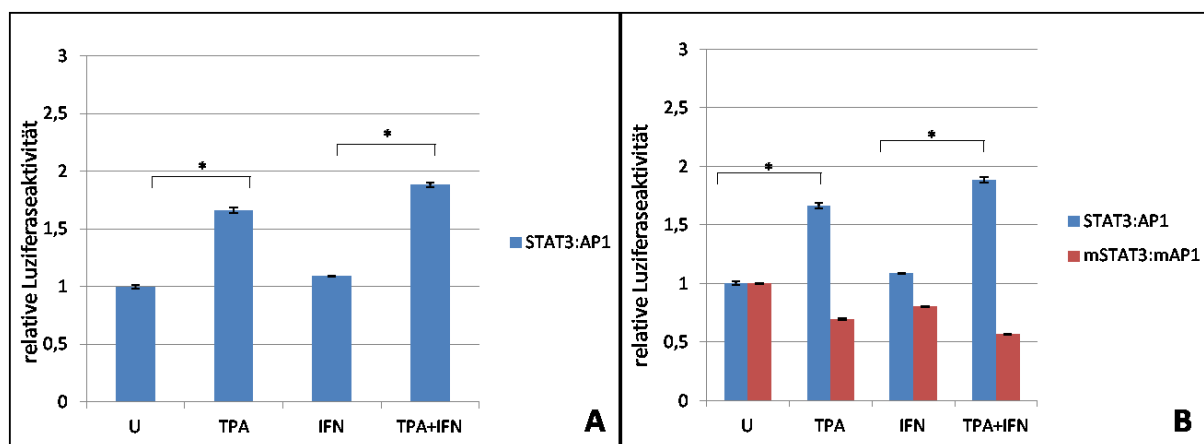


Abb. 20: Analyse der faktorabhängigen Reporterogenaktivitäten von MMP-1-Promotor-Konstrukten. Zellen wurden transient mit „STAT3:AP1“-Konstrukt transfiziert. Nach ca. 15h Inkubation wurden STAT1 und AP-1 mit jeweils 100ng/ml IFN- γ bzw. 100nM TPA aktiviert und anschließend die Reporterogenaktivitäten gemessen. Der Referenzwert der Luciferase-Aktivität (unstimulierte Zellen) wurde auf 1 festgelegt, die Vergleichswerte sind auf diesen Wert bezogen. Zum Vergleich werden die Ergebnisse der Zellen, transfiziert mit dem Promotor „mSTAT3:mAP1“ dargestellt. *P < 0,05

Wenn IFN- γ als Aktivator von STAT1 allein verwendet wird, scheint STAT1, wie erwartet, nicht an das „0,6kb“-Konstrukt binden zu können - der stimulatorische Effekt ist minimal (A). Interessant ist allerdings, dass es wahrscheinlich eine erhöhte Transkription gibt, wenn IFN- γ gemeinsam mit TPA eingesetzt wird. Der Faktor beträgt 1,8. Eine Überlegung wäre, dass STAT1 in diesem Fall STAT3 substituiert und der Komplex STAT1:AP1 an die AP-1-Bindungsstelle binden kann.

Gestützt wird diese Überlegung dadurch, dass bei der Stimulation mit IFN- γ und IL-6 keine Transkriptionsaktivität messbar ist. IFN- γ kann nicht als Ersatz für AP-1 arbeiten (Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrolle sind auch die Ergebnisse der Transfektion mit mSTAT3:mAP1 gezeigt (B). Durch diese Mutationen kann sich weder aktiviertes STAT1 noch AP-1 an die Bindungsstellen anlagern, eine transkriptionelle Aktivierung findet bei keiner der Proben statt.

Anschließend wurden die Zellen mit dem Konstrukt, welches eine Mutation in der Bindungsstelle für STAT3 enthält, transfiziert („mSTAT3:AP1“). Die Ergebnisse zeigt Abbildung 21/rote Balken.

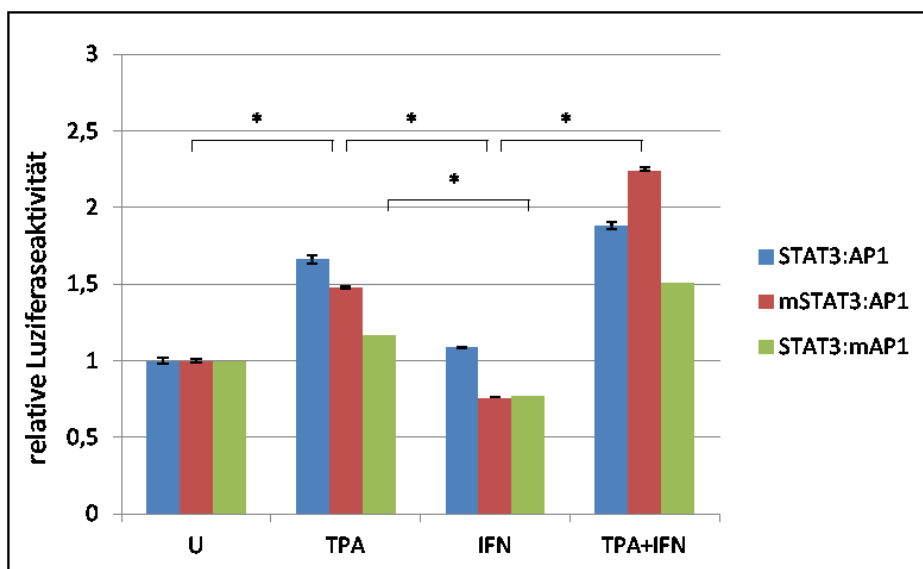


Abb. 21: Analyse der faktorabhängigen Reporterogenaktivitäten von MMP-1-Promotor-Konstrukten mit mutierten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.

Zellen wurden transient mit „mSTAT3:AP1“-Konstrukt (3 μ g pro 1Mio Zellen) bzw. „STAT3:mAP1“-Konstrukt (3 μ g pro 1Mio Zellen) transfiziert. Nach ca. 15h Inkubation wurden STAT1 und AP-1 mit jeweils 100ng/ml IFN- γ bzw. TPA aktiviert und anschließend die Reporterogenaktivitäten gemessen. Der Referenzwert der Luciferase- Aktivität (unstimulierte Zellen) wurde auf 1 festgelegt, die Vergleichswerte sind auf diesen Wert bezogen.

Zum Vergleich werden die Ergebnisse der Zellen, transfiziert mit dem unmutierten Promotor „STAT3:AP1“ dargestellt. Die Standardabweichungen sind zum Teil so klein, dass die graphisch nicht umgesetzt werden konnten. *P \leq 0,05

Durch die Mutation wird verhindert, dass aktiviertes STAT3 an die DNA binden kann. AP-1 kann sich nach Stimulation weiterhin an das 0,6kb-Konstrukt binden- die Stimulationsfähigkeit verändert sich kaum. Die Bindungsfähigkeit und damit Stimulationsfähigkeit von IFN- γ wurde durch die Mutation nicht geändert.

Nun wurde das Konstrukt in die Zellen eingebracht, was eine mutierte AP-1-Bindungsstelle und eine unmutierte STAT3-Bindungseinheit beinhaltet (STAT3:mAP1). Die Ergebnisse zeigt Abbildung 21/grüne Balken.

Die oben bereits beschrieben, sinkt die Stimulationsfähigkeit von TPA durch die Mutation der Bindungsstelle. Ebenfalls bei der Stimulation von TPA gemeinsam mit IFN- γ fällt die Transkriptionsaktivität, in diesem Fall sinkt der Stimulationsfaktor auf 0,6.

Damit erhärtet sich die aufgestellte These, dass AP-1 im Komplex mit aktiviertem STAT3 und auch STAT1 vor allem an die AP-1-Bindungsstelle bindet.

6 Diskussion

6.1 Interaktion von STAT3 mit dem MMP-1-Promotor

Bereits in den neunziger Jahren wurde die fehlgesteuerte Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 in hämatopoetischen und auch soliden humanen Tumoren nachgewiesen (Bromberg *et al.*, 2002). Mittlerweile wird STAT3 wie auch MMPs (Matrixmetalloproteinasen) in vielen Fällen mit kontinuierlichem Tumorwachstum, verringerter Apoptoseanfälligkeit der kanzerogenen Zellen sowie einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert (Airola *et al.*, 1999, Hofmann *et al.*, 2000; Yu und Jove, 2004; Nikkola *et al.*, 2005; Kusaba *et al.*, 2006). Im Vorfeld dieser Arbeit untersuchte die Arbeitsgruppe Friedrich die Beziehung zwischen der STAT3-Funktion, MMP-Expression und der Malignität von Karzinomzellen verschiedener Tumorentitäten genauer. Als Ausgangspunkt konnte nachgewiesen werden, dass aktiviertes, phosphoryliertes STAT3 zu 90% in Kolorektalkarzinom(CRC)-Biopsien vorliegt. Die Ergebnisse von Migrationsassays an CRC-Zelllinien führten zu der Interpretation, dass eine STAT3-Überexpression die Proliferation von Kolonkarzinomzellen und damit die maligne Invasivität signifikant steigert. (Corvinus *et al.*, 2005; Tsareva *et al.*, 2007). Desweiteren wurden immunhistochemische Versuche mit Lungenkarzinombiopsien durchgeführt, die eine räumliche Kolo-kalisation zwischen der Expression der Matrixmetalloproteinase MMP-1 und STAT3-Aktivität nachweisen konnten. Invasions- und Reporter-gen-Assays mit der Kolorektalkarzinom-Zelllinie HT29 zeigten eventuell eine Korrelation zwischen aktiviertem STAT3 und erhöhter MMP-Expression. Zwar wurden in diesem Zusammenhang sechs potentielle STAT3- Erkennungssequenzen (MMP1A-MMP1F) auf dem 4,3kb MMP-1-Promotor identifiziert, allerdings konnte im Protein-DNA-Bindungsassay EMSA eine hoch-affine phospho-STAT3-Bindung nur an der distal gelegenen MMP-1A-Bindungsstelle verifiziert werden (Tsareva *et al.*, 2007). Sich anschließende Reporter-genassays mit einer mutierten MMP-1A-Variante zeigten, dass die Rolle der MMP-1A-Bindungsstelle trotz hoher STAT3-Bindungsfähigkeit minimalen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung von MMP1 hat (Zugowski *et al.*, 2011).

In dieser Arbeit wurden zur Erweiterung dieser Befunde alternative Protein-DNA-Bindungsassays verwendet - das ABCD-Verfahren und die Chromatinimmunpräzipitation ChIP. Im Gegensatz zu den EMSA-Ergebnissen von Tsareva *et al.* zeigen die Versuche, dass sich phospho-STAT3 an jede der sechs potentiellen Bindungsstellen anlagern kann. Da in dem von Tsareva angewandten Bindungsassay EMSA sehr wenig Protein eingesetzt werden kann, lässt sich vermuten, dass das ABCD-Assay mit seiner größeren Menge an Zelllysat auch schwächere Bindungen von Protein an die DNA nachweisen kann.

Um einer Beschreibung der Situation in lebenden Zellen näher zu kommen, wurde neben der ABCD-Analyse außerdem das ChIP-Verfahren speziell für die STAT3-Bindungsstelle „MMP1D-AP1“ (gleich bedeutend mit „STAT3-AP1“) angewandt. Hier liegt eine AP-1-Bindungseinheit nur 12bp von der STAT3-Bindungsstelle entfernt. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass das 0,6kb große Fragment mit STAT3 und AP-1-Bindungsstelle im Reporterassay 30% der Reporteraktivität des gesamten MMP-1-Promotors vermittelt (Zugowski *et al.*, 2011). Die ChIP zeigte, dass sich phospho-STAT3 tatsächlich an die native MMP1D-AP1-Bindungsstelle im Chromatin anlagern kann. Damit sind die Ergebnisse der ABCD-Untersuchung für diese Bindungsstelle verifiziert. Es wird gezeigt, dass die in Isolierung mögliche Bindung auch im Kontext der lebenden Zelle stattfindet und mit der zuvor experimentell gezeigten Transkription kompatibel ist. Offen ist, ob diese Beobachtung auch auf die anderen fünf potentiellen phospho-STAT3-Bindungsstellen zutrifft. Dies könnte mit weiteren ChIP-Experimenten überprüft werden.

6.2 STAT3-c-Jun-Interaktion und transkriptionelle Aktivierung an der STAT3-AP1-Bindungsstelle

Wie STAT3 spielt auch c-Jun als Teil von AP-1 eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von kolorektalen Karzinomzellen. So wurde die Beteiligung von c-Jun als ein im Kern vorkommendes Onkoprotein, involviert in die Zelltransformation, frühzeitig nachgewiesen (Vogt, 2001).

Eine Interaktion zwischen den Transkriptionsfaktoren c-Jun und phospho-STAT3 wurde bereits in H35-Rat-Hepatoma-Zellen dokumentiert. Dabei bindet STAT3 über seine Coiled-coil-Domäne an AP-1. Durch Phosphorylierung an Y705 verstärkt sich die Bindung um das siebenfache. Dass diese Transkriptionsfaktoren-Interaktion eine Rolle im Organismus spielt, zeigt das Ergebnis folgenden Experimentes: Wird die AP-1-Expression mit Hilfe von siRNA herab reguliert, sinkt auch die Transkription von IL-6-induzierten STAT3-Zielgenen. Dieser Nachweis erfolgte durch Luciferase-Reporterassays mit dem jeweiligen Promotor für α 2-Macroglobulin und SOCS in HepG2-Zellen (Zhang *et al.*, 1999; Ginsberg *et al.*, 2007).

Von der Arbeitsgruppe Friedrich durchgeführte Untersuchungen von Biopsien kolorektaler Karzinome ergaben eine erhöhte spezifische DNA-Bindungskapazität der Transkriptionsfaktoren STAT3 und AP-1, wenn diese gemeinsam in den Zellen vorkamen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Korrelation zwischen hyperaktivem STAT3 und AP-1 existiert. Darauf aufbauend konnte an (auch in dieser Arbeit verwendeten) HT29-Zellen in ABCD-Versuchen mit artifiziellen Fragmenten des MMP-1-Promotors gezeigt werden, dass sich phospho-STAT3 sowohl an die STAT3-AP1-Bindungseinheit „STAT3-AP1“ als auch an die isolierte STAT3-Bindungseinheit anlagern kann. Lag die

STAT3-Bindungseinheit mutiert vor, kam keine Bindung zu Stande. AP-1 bindet sowohl an die STAT3-AP1-Bindungseinheit „STAT3-AP1“ als auch an die einzeln vorliegende AP-1-Bindungseinheit. Als interessant erwies sich hier, dass sich AP-1 auch an der isoliert vorliegenden STAT3-Bindungsstelle nachweisen ließ, genauso wie STAT3 an der separat vorliegenden AP-1-Bindungsstelle dokumentiert werden konnte (Dissertation A. Müller; Corvinus *et al.*, 2005).

Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit weitgehend reproduziert werden und sprechen für eine DNA-Bindung als Komplex STAT3:AP1. Zusätzlich wurde auch hier eine ChIP-Untersuchung durchgeführt, die, wie im Fall von phospho-STAT3, zeigt, dass c-Jun an das native Erkennungselement mit STAT3- und AP-1-Bindungsstelle „STAT3-AP1“ im MMP-1-Promotor binden kann.

Ein weiteres Beispiel für die STAT3-AP-1-Interaktion in anderen Zelltypen ist das Onkostatin-M-responsive Element (OSME), welches sowohl eine AP-1 als auch eine eng benachbarte STAT3-Bindungsstelle enthält und beispielsweise in den Promotoren des MMP-1-, MMP-3-, MMP-9- und auch des TIMP-1-Gens vorkommt. Hier konnte in Astrozyten und Hautfibroblasten mittels Luciferase-Reporter-Gen-Assays nachgewiesen werden, dass eine maximale Induktion der genannten Gene erst durch eine gemeinsame Bindung der Transkriptionsfaktoren stattfindet (Korzus *et al.*, 1997). Einen gemeinsamen Einfluss haben STAT3 und AP-1 auch auf die Genexpression von I-CAM1 in HepG2-Zellen (Schirunga *et al.*, 2001).

Zusätzlich beschrieben Carey *et al.*, dass Transkriptionsfaktoren, die zwar unabhängig voneinander, aber eng benachbart an Promotoren binden, sich in Säugerzellen gelegentlich stark im Bezug auf ihre Bindungsfähigkeit beeinflussen können (Carey, 1998).

Auf Basis dieser Erkenntnisse forschten Itoh *et al.* an Blasenkarzinomzellen. Den Ausgangspunkt stellte hier die phospho-STAT3-Stimulation mittels EGF dar. Es konnte gezeigt werden, dass die MMP-1- und MMP-10-Expression durch EGF-Stimulation gesteigert wird. Wurde dominant negatives STAT3 in die Zellen eingebracht, konnte kein Stimulationseffekt mehr erzielt werden. Ähnlich wie im oben beschriebenen OSME liegt die STAT3-Bindungsstelle eng benachbart zur AP-1-Bindungsstelle im MMP-1-Promotor. Mittels Bindungsassays dokumentierte man, dass die phospho-STAT3-Bindung abhängig von der AP-1-Bindung an die DNA ist, was umgekehrt nicht zutrifft. Durch ein EMSA-Bindungsassay wurde c-Jun klar am MMP-1-Promotor nachgewiesen, während STAT3 in Blasenkarzinomzellen nur eine schwache DNA-Bindung zu besitzen scheint. Immunpräzipitationversuche mit mutierten Bindungsstellen zeigte, dass der Komplex c-Jun:STAT3 vor allem über AP-1 an die DNA binden kann (Itoh *et al.*, 2006). Eine Aussage über die transkriptionelle Aktivierung durch AP1 und STAT3 mittels Reporter-Gen-Assay wurde hier allerdings nicht getroffen.

Um zu untersuchen, inwiefern die beschriebenen Protein-DNA-Interaktionen einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung haben, wurden im Rahmen dieser Arbeit Reporter-Gen-Assays mit HT29-

Zellen durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei einer dualen Stimulation mit IL-6 und dem Phorbolster TPA, die jeweils STAT3 bzw. AP-1 aktivieren, eine maximale transkriptionelle Aktivierung des Minimalfragments des MMP-1-Promotors „0,6kb“ mit der STAT3-AP1-Bindungseinheit „STAT3-AP1“ erreicht werden konnte. Wurden IL-6 oder TPA einzeln eingesetzt, erfolgte eine wesentlich niedrigere Stimulation. Diese Ergebnisse erhärten die These, dass eine Bindung als Komplex STAT3:AP1 stattfinden und so eine maximale Induktion der nachgeschalteten Gene implizieren kann. Wurde eine der Bindungsstellen mutiert, lag eine niedrigere transkriptionelle Induktion vor. Dabei fiel auf, dass eine Mutation der AP-1-Bindungsstelle sich erheblich mehr auf die Stimulierbarkeit auswirkte als eine entsprechende Abwandlung der STAT3-Bindungsstelle.

Das würde bedeuten, dass STAT3 die MMP-1-Expression durch verschiedene Mechanismen reguliert. Zum einen lösen Komplexe, bestehend aus STAT3 und AP-1, vor allem über die Bindung an die AP-1-Bindungsstelle eine Transkriptionsaktivität aus, vergleichbar mit den transkriptionellen Vorgängen in den von Itoh verwendeten Karzinomzellen. Dabei erfolgt der primär aktivierende Effekt von STAT3 auf die MMP-1-Genregulation größtenteils durch eine Protein-Protein-Interaktion mit AP-1, welches die Bindung von STAT3 an die DNA stabilisiert. Die STAT3-Bindungsstelle wäre in diesem Fall von sekundärer Bedeutung. Gegen diese Überlegung spricht, dass ein zugesetzter Inhibitor von JAK, einer Kinase, die in die Aktivierung von STATs involviert ist, die MMP-1-Expression erheblich mindert, obwohl der JAK-Inhibitor kaum Einfluss auf die AP-1-Aktivierung hat (Curran und Murray, 1999). Zum Anderen existiert eine direkte Interaktion durch hoch-affine Bindung an die MMP-1A-Bindungsstelle. Dabei zeigen Mutationsexperimente, dass die MMP-1A-Bindung im Gegensatz zur STAT3-Bindung an die MMP-1D-Bindungsstelle nur einen geringen Effekt auf die Genregulation hat (Zugowski *et al.*, 2011).

Interessant ist die Fragestellung, ob eine Komplexbildung auch mit unphosphoryliertem STAT3 möglich ist. Durchgeführte Zellfraktionierungen wiesen signifikante Mengen an unphosphoryliertem STAT3 im Zellkern von HT29-Zellen nach, was für eine solche Möglichkeit sprechen würde (Dissertation A. Müller).

Zu Bedenken ist, dass Transkriptionsfaktoren meist mit anderen Proteinen zusammen wirken und damit die Genexpression vielschichtig beeinflussen. So wurden auch bereits sowohl für STAT3 als auch für AP-1 Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen: STAT3 reguliert gemeinsam mit NF-kappaB die transkriptionelle Aktivierung von RANTES, IL-6, IL-8 und c-Met (Yang *et al.*, 2007). Auch die durch die STAT3-Bindung induzierte Genexpression wird außer durch STAT3 durch eine Vielzahl anderer Faktoren wie zum Beispiel STAT1 und STAT5 beeinflusst (Sato *et al.*, 1993; Corvinus *et al.*, 2005; Moriggl *et al.*, 2005). AP-1 hingegen reguliert die MMP-1-Expression nicht nur gemeinsam mit STAT3; es konnte bereits in einer Kooperation mit ETS nachgewiesen werden (Rutter *et al.*, 1998). Weiterhin kann c-Jun mit NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*)

einen Komplex bilden. Dabei verändert sich die Konformation von c-Jun, sodass zusätzlich neue DNA-Bindungsstellen zugänglich werden können (Ramirez-Carrozzi und Kerppola, 2003). Ob eventuell weitere Konformationsänderungen auch bei STAT3:AP1 auftreten und welches Ausmaß diese haben, bleibt zu klären. Dabei muss immer bedacht werden, dass der MMP-1-Promotor eine Vielzahl anderer Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel für GATA (T-Zell-Transkriptionsfaktor) oder auch ETS besitzt, die Einfluss auf die transkriptionelle Aktivierung nehmen (Bidder *et al.*, 2000; Behera *et al.*, 2004).

6.3 STAT1 als möglicher Substituent für STAT3 in der Interaktion mit c-Jun

Neben STAT3 beschäftigt sich diese Arbeit auch mit STAT1. Wie auch bei STAT3 wird in Tumoren häufig eine konstitutive Aktivierung von STAT1 beobachtet. Die funktionelle Bedeutung ist offenbar unterschiedlich, wobei beispielsweise bei Brustkrebs eine erhöhte STAT1-Konzentration für eine längere Überlebenszeit und bessere Prognose spricht (Bowman *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu kann STAT1 bei Leukämien und Lymphomen in Mäusen durch die Beeinflussung von MHC I die Progression beschleunigen und damit die Prognose entscheidend verschlechtern (Kovacic *et al.*, 2006). Beim CRC enthielten die bereits erwähnten untersuchten CRC-Biopsien neben STAT3 und AP-1 in den meisten Fällen STAT1 (Corvinus *et al.*, 2005).

Interessant ist, dass STAT1 und STAT3 aufgrund ihrer starken strukturellen Ähnlichkeit in ihren Aufgaben in manchen Situationen zu interagieren scheinen. So kann beispielsweise der STAT3-aktivierende gp130-IL-6-Rezeptor auch STAT1 ansteuern, wenn STAT3 abwesend ist (Costa-Pereira *et al.*, 2002). Dies erklärt die Beobachtung, dass STAT1 und STAT3 trotz ihrer unterschiedlichen Funktionen im Organismus von gleichen Stimulatoren aktiviert werden können (Qing und Stark, 2004). Zusätzlich besteht auch die Möglichkeit der Heterodimerbildung zwischen beiden Transkriptionsfaktoren, die bereits im CRC beobachtet wurde (Corvinus *et al.*, 2005).

Im Bezug auf das Themengebiet dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass STAT1 sich anstelle von STAT3 an die Transkriptionsfaktoren Jun-B und Fos als Untereinheiten von AP-1 anlagern kann und somit auf die Expression von MMP-1 wirkt. Eine Bindung von STAT1 an c-Jun konnte trotz einer postulierten Bindungsstelle bisher nicht nachgewiesen werden (Zhang *et al.*, 1999).

Um diesen Umstand genauer zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit Reporterassays durchgeführt. Wurde durch IFN γ -Stimulation STAT1 in HT-29-Zellen aktiviert, ist der stimulatorische Effekt auf die transkriptionelle Aktivierung des Minimalfragments des MMP-1-Promotors „0,6kb“ mit der STAT3-AP1-Bindungseinheit „STAT3-AP1“ minimal. Dies war zu erwarten, da in zuvor durchgeführten ABCD-Versuchen keine STAT1-Bindung an die kombinierte AP-1-STAT3-

Bindungsstelle nachgewiesen werden konnte. Wird IFN γ allerdings gemeinsam mit dem c-Jun aktivierenden TPA eingesetzt, ist eine erhöhte Transkription nachweisbar. Nach Mutation der AP-1-Bindungsstelle sinkt die transkriptionelle Aktivierung trotz dualer Stimulation, während die erhöhte Induktion der Transkription bei mutierter STAT3-Bindungsstelle und Stimulation mit IFN γ und TPA weiterhin bestehen bleibt. Eine vorläufige Interpretation dieser Ergebnisse ist, dass STAT1 in dieser Situation STAT3 substituieren und sich der Komplex STAT1:AP1 an die AP-1-Bindungsstelle anlagern kann.

6.4 Ausblick

Es wäre interessant, die Bindungsfähigkeit der Transkriptionsfaktoren AP-1, STAT1 und STAT3 einzeln und im Komplex weiter zu untersuchen. So könnte man das ChIP-Bindungsassay, welches der physiologischen Situation am nächsten kommt, für die weiteren oben genannten potenziellen phospho-STAT3-Bindungsstellen im MMP-1-Promotor etablieren. Zusätzlich überlegenswert wäre, eine „Two-Step-ChIP“ durchzuführen. Dabei werden zwei Immunpräzipitationen, jeweils auf einen Transkriptionsfaktor ausgerichtet, mit einem Zelllysat nacheinander durchgeführt. So kann bei einer zuvor dokumentierten Komplexbildung überprüft werden, welcher Transkriptionsfaktor zuerst an die DNA bindet und welcher sich hauptsächlich über Protein-Protein-Interaktion anlagert. In diesem Fall könnte also nachgewiesen werden, ob die Komplexe STAT3:AP1 und STAT1:AP1 tatsächlich, wie bisher in den Reporterassays nahegelegt, hauptsächlich über AP-1 binden.

Auf lange Sicht wäre es auch interessant, mit nicht-humantoxischen Inhibitoren zu experimentieren, welche die Bindung der Komplexe einschränken bzw. verhindern und damit die maximale Induktion des MMP-Gens unterbinden. Das Bestreben, gezielt das physiologische Gleichgewicht der MMPs zu ändern, besteht bereits seit Jahren. So konnte schon 1996 gezeigt werden, dass der monoklonale Antikörper Batimastat als MMP-Inhibitor die Ausbreitung solider intraperitonealer Tumoren *in vivo* in Ratten reduzieren kann und damit für signifikant verlängertes Überleben sorgt (Watson *et al.*, 1996; Aparicio *et al.*, 1999). Ein anderer Ansatz ist, den src-Kinase-Einfluss und die damit verbundene Signaltransduktion in kolorektalen Zellen zu beeinflussen (Emaduddin *et al.*, 2008). Ebenfalls versucht wurde, gezielt die MT1-MMP-gesteuerte Lyse des extrazellulären Raums einzuschränken, womit ebenfalls eine Metastasierung weitgehend unterdrückt werden konnte (Takino *et al.*, 2007). Letztendlich aber konnte bisher durch MMP-Inhibition kein zufriedenstellender Therapieansatz des CRC erreicht werden.

Momentan beinhaltet die Signaltransduktionstherapie kolorektaler Karzinome eine Ansteuerung einzelner Zielfragmente. So werden monoklonale Antikörper wie Bevacizumab, Cetuximab oder

Panitumumab eingesetzt, die anderweitig nachhaltig in die Signaltransduktion der Krebszellen eingreifen, etwa über EGF und VEGF.

Eine zukünftige Perspektive wäre eine individualisierte Inhibition kombinatorisch wirksamer Faktoren. Auf diese Weise könnte eine spezifische Medikation für die jeweiligen Tumorzellen erfolgen und damit ein besseres Outcome erzielt werden. In diesem Zusammenhang wäre die MMP-1-Expression sicherlich ein interessanter Marker bei Tumoren im Bezug auf Metastasierung und Prognose.

7 Anhang

7.1 Plasmidkarten

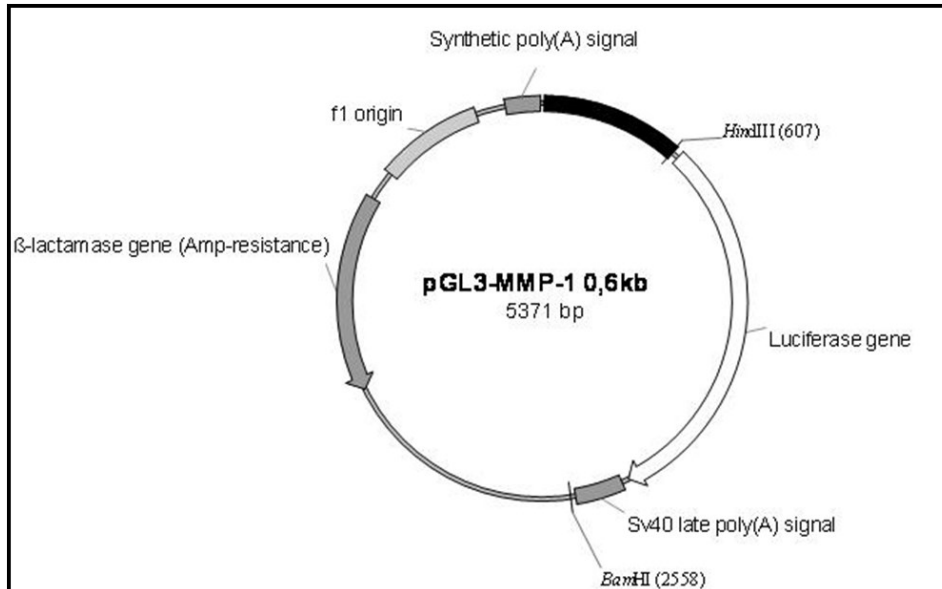


Abb. 22: Karte des Plasmides pGL3-MMP-1 0,6kb (Anwendung bei Reportergenassays)

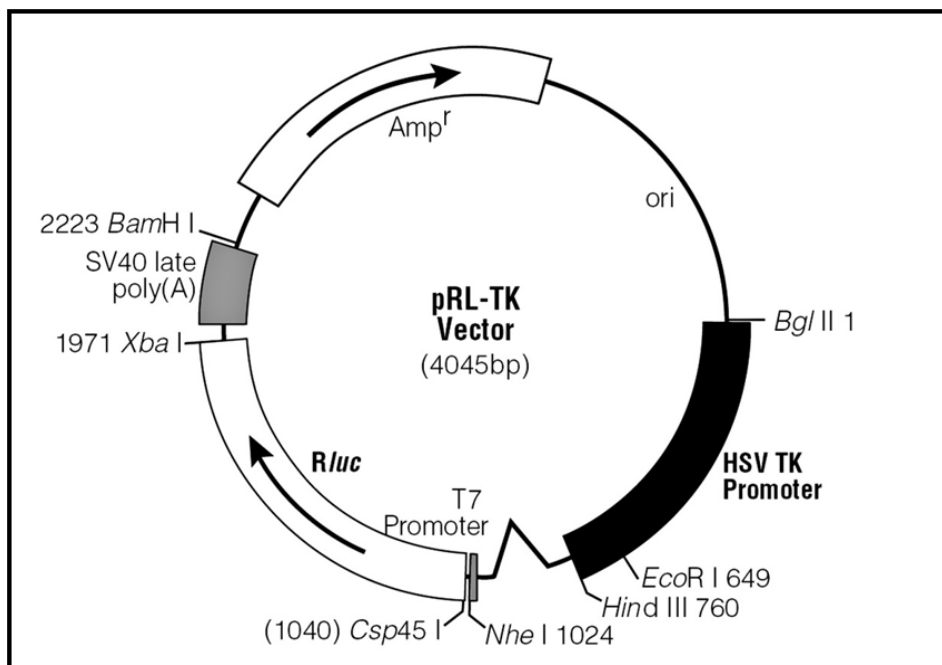


Abb. 23: Karte des pRL-TK-Vektors (Anwendung bei Reportergenassays)

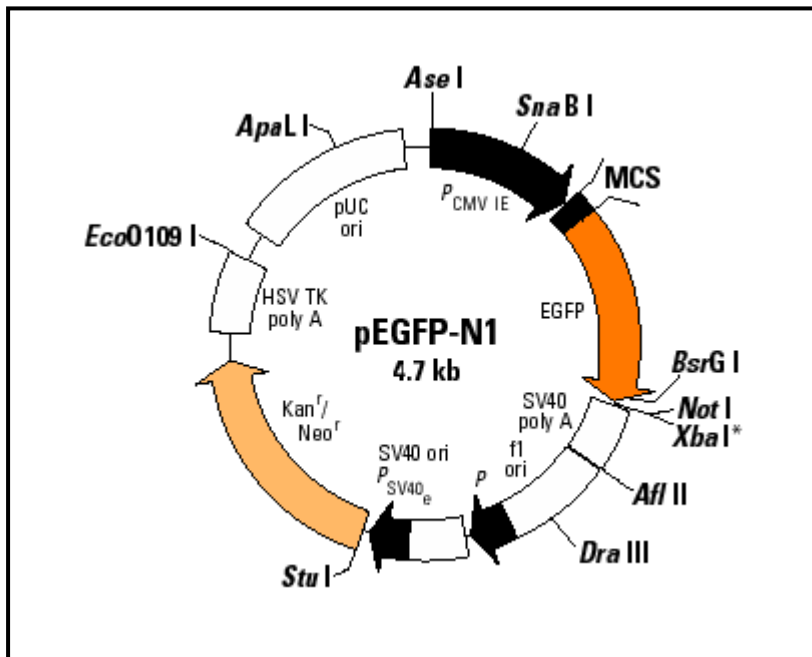


Abb. 24: Karte des pEGFP-N1-Vektors (Anwendung bei Transfektionsversuchen)

7.2 DNA-Sequenzen des humanen MMP-1-Promotors

```

-4272 cctcacatat ttcaaatcca tctcaaattc acattcacag atgtaagagc tgggaaagga
-4212 cggtttttgac agggctgaac tgagctatgg tatgagtagc actcatcccc agaaagtctc

-4152 ttggttttgaa SBE-MMP-1A aaggagctat agctgcaaaa atctgtttca caaatgtgct
-4092 aactataagc ttccgggaa gtgtttaata aaccatgcag ataagaaaat attattgaca
-4032 aacaaaattaa taaaatgctc aaaataatct gatactaaat gctttagtagc tggcatgcaa
-3972 atcaccaaaa ataaatgtgc tatgcttcat ataaaatctc cagtaaggct ggggtgtggtg
-3912 gctcacacct ataatcccaa cactctggga ggccgaggtg agagaactgc ttgaggccag
-3852 gagtttgaga ctagcctggc caacatagtg agacctcatc tctacaaaaa atcttaaaaa
-3792 tcagtgggac atggtggtgc acatctgtag ttctagctac ttgggagtct gaggcaggaa
-3732 gattgcttaa gcccaagagt ttgaggtccc taccctccag cctaagcgac agaggagac
-3672 cttgtctcta aataaataaa ttagttaatt gaatgtccag tcagttgata tatccaaatt
-3612 cttcccatgg taatttttaa aactttagtc ttaggagagt aaaagtcag gacataagac
-3552 ttcttataaa caactcagcc taatgagaaa tagaccctgt atttaagtgt catttaagta
-3492 tctatttctt cattgatcta ttcatttatt aactcctgta acaatcattt gcagacacct
-3432 actatgttga ggtagtataa actataaatt caacaagttt gataaggga ataaagagaga
-3372 ttgagtgaac gcttgaaggg gaggattctt tcaggcctgt gggaccgggt ggtggcatgg
-3312 agacattatt gtggacttga gggagttaat gtgacagtcc tcgtgtctcc agacactttc
-3252 tctctgttag ggaagcaaga tttctatccc cagagtatgt atgtgttatg tctggactgc
-3192 agtggcacag aactgtgttc aacgagtgcac taccgctctg ctgtgtgccc tgggacttgg
-3132 ggtaattga tcaatcattt ctatccagaa ggtaaccatg aggactgacg gaaccagtgt
-3072 gtaccaagtg tctgttaagt gtctggtcaa tggttatcca taaagctact gcatggccat
-3012 atgtaggaag aatacacacc gtgagcaaat tttcccacg tgtaactctc acaaaaaaat
-2952 agcattaaat acttaattgt tctggctaaa gaccatttca agacttgcag gacaaaaaaa
-2892 tagaaaaaat atctgacact caaatggagt tacaaaaatta aaacggctga attccccagc
-2832 ataaaaaaat atgaagcaag attgaaattt caagactaag tttaatatgg aaaaaatacaa
-2772 atatgtttga ggcctttcac agagcagcca gcatgaagca accaagaaaa ccacggaaat
-2712 aatctggctg cctggaaata gtccggagtc agctgacaca gccacacgag agccctctta
-2652 tgcttgtcat aaggggtaaa ggaataattt cagaaaatta catttaaaag agaattatgg
-2592 gggaagaaga tgctcccaga ggaaacaaat agtatggatg tgaagagcaa atacaacttt

SBE-MMP-1B
-2532 aacatgtttt gaacttcttg gaaactatgc taagtttagg cattgctagg atttggtagt
-2472 atttaaatccc cagctttctg ttctaaattt ttgttttctt ttttactctc aaataaatca

SBE-MMP-1E
-2412 tatgctagca ccagctgcaa agttacatat gttgtattag acgatcttcc atgaatacct
-2352 aactggaaat tccaagattc agggccatgt gaatctaggc tggctgctta accaaaactt
-2292 aatttaattt ttttcgttta ttttaggaaa aaaaattaac gaaaagatgt ttcaagcaac
-2232 cagtttccaa tccacgtcag caactatgac atttaatgaa acactgtgag catttagcat
-2172 gagagctctg gactcagatg caggagctt tgctagagaa gggaggaaaa agcaggcatg
-2112 atgtggcggg ttgtggggga ctccaaggct ctatttccaa ctccatcag agaacttctg
-2052 ttttcacctg gttttcaaat ttgttttcca aaagggattt tgtttaagta aaggatacag
-1992 aggtttataa aagtttgaaa acttctacat tgccagatgt gcagctctt gccagatggg
-1932 acagtgtatg agactcttcc aggggtgacgt cttaggcaat ttcctgtcca atcacagatg
-1872 gtcacatgct gctttcctga gttaacctat taactcacc ttgtttccca ggcctcagt
-1812 gagctaggct tgtcacgtct tcacagtgcac tagattccct cacagtgcag tataatctgcc
-1752 actccttgac ttttaaaaca tagtctatgt tcacctcta atatgaagag cccctttcac
-1692 tattttcttt gtctgtgctg gactcacttc agtggcaagt gttctttggt ctctgccgca
-1632 ccctccctct gatgcctctg agaagaggat ttccttttcg tgagaatgtc ttcccattct
-1572 tcttaccctc ttgaactcac atgttatgcc acttagatga ggaaattgta gttaaataat
-1512 tagaaagata tgacttatct caaatcaatc caagatatac tgaagtattg tttatgagta
-1452 agatatcagt cttgacgcag aaagaaaaca ggaatccata aggggaggaa agtggtgaaa
-1392 agcaaacctg atacagtggg aaaggtggga gacaccataa ggtgctgaag tgataaaaaa

SBE-MMP-1F
-1332 ggccagtgtt tctccactgt atgttttcaa taaatgcttc caaggaagga gagtggggca
-1272 tgagtagggg agctacagag ataaaccaac ttttcttacc aggaatgcta cagatagcac
-1212 tggtagacac ggtcaccagt acccaagaca atttaattgt gaacataagt acaggaatac
-1152 acatctttca ttacagagcc atgtatttat ttttaatggc aggagatgct aaataagatc
-1092 ttttgaatgg aggaatgcat aaatatatga atgaatgcat acatgaaaga ataaataaat

```

```

-1032 gctgcctagc accaaggagc gaagatagac tcatatcaag ggaaacaagt atgattaaaa
-972 ataagacccc agagtcacgc tcagtcctct tccagccttt tcatcatccg gtacattcag
      SBE-MMP-1C
-912 acaagt ttca gggaaggatc ctatgtgtcc catgataatg atgggcaagg ggtggggagt
-852 tatctcatac tccgcctgtg gatgaggggt cttctcaggt aaggctctta aatcctaggc
-792 ctgagtaaat tttttcaaat tttattttag acaggggtccc tctctgttgc ctaggctgga
-732 gtgcagcggc acaatcacag ctcaatgcag cctcaacctc ccaggcccaa gtgatcctcc
-672 cacctcagcc tcttcagtga ctaggactac aggtgcatga ctccatgctt ggctaacttt
-612 aaaaaatggt tggttggttg tttgtttttt acagagatgg ggtctcacca tgttgcccag
-552 gctgatcttg aactcctggg ctcaagtgat tcccctgcct cggcctcctg aaattctggg
-592 attataggct tgagccacca tgcctggctc tgagtaaaga ttaagggaag ccatggtgct
-532 atcgcaatag ggtaccaggc agcttaacaa aggcagaagg gaacctcaga gaaccccgaa
-472 gagccaccgt aaagtgagtg ctggggggagc tgaacttcag tcagtacagg agccgaacag
-412 ccatcagggtg cgcagtgtta gtaattccac cctctgccct gggagcaagg tgtgtggaga
-352 aacctgtagc actttatgac catcagaacc agcctttttc aaaaagacca tggagtactc
-292 ttgacctgt gtatataaca agaacctttc tcaaatagga aagaaatgaa ttggagaaaa
-232 ccactgttta catggcagag tgtgtctcct tcgcacacat cttgtttgaa gttaatcatg
-172 acattgcaac accaagtgat tccaaataat ctgctaggag tcaccatttc taatgattgc
      APIBE
-112 ctagtctatt catagctaata caagaggatg ttataaagca tgagtcagac acctctggct
      SBE-
      MMP-1D
-52 ttctggaagg gcaaggactc tatatataca gagggagctt cctagctggg atattggagc
      9 agcaagaggc tgggaagcca tcacttacct tgcactgaga aagaagacaa aggccagt

```

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Adenom- Karzinom- Sequenz
Abb. 2	Die Domänenstruktur der STAT-Proteine
Abb. 3	Die Domänenstruktur von c-jun
Abb. 4	Einfluss von AP-1 auf die Proliferation von Zellen
Abb. 5	Übersicht zum pro- und antiapoptotischen Einfluss von AP-1 auf Zellen
Abb. 6	Schematischer Komplex eines ABCD
Abb. 7	Schematischer Ablauf einer Chromatin- Immunopräzipitation
Abb. 8	Schematischer Ablauf eines Reporterassays
Abb. 9	Potentielle Bindungsstellen im MMP-1-Promotor mit hoher Affinität für phospho-STAT3
Abb. 10	20% Polyacrylamidgel zur Überprüfung der Ausbildung von DNA-Hybriden aus Oligonukleotiden
Abb. 11	stimulationsabhängige Interaktion von STAT3 mit dem STAT3-Bindungselement „MMP-1A“
Abb. 12	Stimulationsabhängige Interaktion von STAT3 mit den potentiellen STAT3-Bindungselementen des MMP1-Promotors
Abb. 13	Stimulationsabhängige Interaktion von STAT3 und AP-1 mit dem STAT3- und dem AP-1 Bindungselement des MMP1-Promotors
Abb. 14	Analyse der <i>in vivo</i> - Bindungen von STAT3 und AP-1 an Bindungsstellen im MMP-1-Promotor durch ChIP
Abb. 15	Zytometrische Überprüfung der Transfektionseffizienz bei HT29- Zellen
Abb. 16	Untersuchung des Einflusses der Zellzahl auf die Transfektionseffizienz bei HT29- Zellen
Abb. 17	Mutationsvarianten des Promotors hMMP1 0,6kb
Abb. 18	Analyse der faktorabhängigen Reporteraktivitäten von MMP-1-Promotor (STAT3/AP1)
Abb. 19	Analyse der faktorabhängigen Reporteraktivitäten von MMP-1-Promotor- Konstrukten mit mutierten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (STAT3/AP1)
Abb. 20	Analyse der faktorabhängigen Reporteraktivitäten von MMP-1-Promotor- Konstrukten (STAT1/AP1)
Abb. 21	Analyse der faktorabhängigen Reporteraktivitäten von MMP-1-Promotor- Konstrukten mit mutierten Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (STAT1/AP1)
Abb. 22	Karte des Plasmides pGL3-MMP-1 0,6kb
Abb. 23	Karte des pRL-TK- Vektors
Abb. 24	Karte des pEGFP-N1-Vektors

7.4 Literaturverzeichnis

Airola K, Karonen T, Vaalamo M, Lehti K, Lohi J, Kariniemi AL, Keski-Oja J, Saarialho-Kere UK. 1999. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br J Cancer*. 80(5-6):733-43.

Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wie S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T. 1994. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*. 77(1): 63-71.

Aktories K und Mitarbeiter, Ausgabe 2010. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. München: Urban und Fischer Verlag.

Alonzi T, Maritano D, Gorgoni B, Rizzuto G, Libert C, Poli V. 2001. Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver. *Mol Cell Biol*, 21 (5):1621-1632.

Alonzi T, Middleton G, Wyatt S, Buchman V, Betz UA, Muller W, Musiani P, Poli V, Davies AM. 2001. Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*, 18 (3):270-282.

Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M. 1987. Phorbol ester inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA- modulated trans- acting factor. *Cell*. 49(6):729-39.

Angel P, Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell- proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1072(2-3):129-57.

Aparicio T, Kermorgant S, Dessirier V, Lewin MJ, Lehy T. 1999. Matrix metalloproteinase inhibition prevents colon cancer peritoneal carcinomatosis development and prolongs survival in rats. *Carcinogenesis*. (8):1445-51.

Arai K, Nishida J, Hayashida K, Hatake K, Kitamura T, Miyajima A, Arai N, Yokota T. 1990. Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by cytokines. *Rinsho Byori*, 38 (4):347-353.

Arnold D, Siewczynski R, Kubicka S, Hacker U, Schmoll HJ. 2008. Colorectal carcinoma--primary treatment in case of advanced metastization *Onkologie*. Suppl 5:3-8.

Aoki N, Matsuda T. 2002. A nuclear protein tyrosine phosphatase TC-PTP is a potential negative regulator of the PRL-mediated signaling pathway: dephosphorylation and deactivation of signal transducer and activator of transcription 5a and 5b by TC-PTP in nucleus. *Mol Endocrinol*, 16 (1):58-69.

Baba M, Itoh K, Tatsuta M. 2004. Glycine- extended gastrin induces matrix metalloproteinase-1- and -3- mediated invasion of human colon cancer cells through type 1 collagen gel and Matrigel. *Int J Cancer*. 108(2):301-6.

Battle TE, Frank DA. 2002. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med*. 2(4): 381-392.

- Baumann S, Dostert A, Novac N, Bauer A, Schmid W, Fas SC, Krueger A, Heinzel T, Kirchhoff S, Schütz G, Krammer PH. 2005. Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer. *Blood*. 106(2):617-25. Epub 2005 Mar 31.
- Becker S, Groner B, Muller CW. 1998. Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA. *Nature* 394(6689): 145-151.
- Behera AK, Thorpe CM, Kidder JM, Smith W, Hildebrand E, Hu LT. 2004. *Borrelia burgdorferi*-induced expression of matrix metalloproteinases from human chondrocytes requires mitogen-activated protein kinase and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathways. *Infect Immun*. 72(5):2864-71.
- Behrens MM, Strasser U, Koh jY, Gwag BJ, Choi DW. 1999. Prevention of neuronal apoptosis by phorbol ester induced activation of protein kinase C: blockade of P38 mitogen-activated protein kinase. *Neuroscience*. 94(3):917-27.
- Bidder M, Loewy AP, Latifi T, Newberry EP, Ferguson G, Willis DM, Towler DA. 2000. Ets domain transcription factor PE1 suppresses human interstitial collagenase promoter activity by antagonizing protein-DNA interactions at a critical AP1 element. *Biochemistry*. 39(30):8917-28.
- Bowman TL, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger WJ, Sedivy JM, Irby R, Yeatman T, Courtneidge SA, Jove R. 2001. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(13): 7319-24.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. 19(21): 2474-88.
- Bradford HF, Jones DG. 1975. Biochemical and morphological studies of the short and long term survival of isolated nerve-endings. *Brain Res* 90(2): 245-59.
- Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR. 1997. Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. *J Pathol*. 182(3): 347-55.
- Bromberg J. 2001. Activation of STAT proteins and growth control. *Bioessays*, 23 (2):161-169.
- Bromberg J, Darnell JE Jr.. 2000. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19(21): 2468-2473.
- Buermeyer A, Deschenes S, Baker S, Liskay R. 1999. Mamalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet*, 33:533-564.
- Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J. 2001. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene*, 20 (55):7925-7934.
- Carey M. 1998. The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell*. 92(1):5-8.
- Chapman RS, Lourenco PC, Tonner E, Flint DJ, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ. 1999. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev*. 13(19): 2604-16.

- Chen X, Vinkemeier U, Zhao Y, Jeruzalmi D, Darnell JE Jr., Kuriyan J. 1998. Crystal structure of a tyrosine phosphorylated STAT-1 dimer bound to DNA. *Cell* 93(5): 827-839.
- Chung C, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*, 278 (5344):1803-1805.
- Corvinus F, Orth C, Moriggl R, Tsareva S, Wagner S, Pfitzner E, Baus D, Kaufmann R, Huber L, Zatloukal K, Beug H, Ohlschl ger P, Schütz A, Halbhuber K, Friedrich K. 2005. Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth. *Neoplasia*, 7 (6):545-555.
- Costa-Pereira AP, Tininini S, Strobl B, Alonzi T, Schlaak JF, Is'harc H, Gesualdo I, Newman SJ, Kerr IM, Poli V. 2002. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proc Natl Acad Sci U S A*;99(12):8043-7.
- Curran S, Murray GI. 1999. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol.* 189(3): 300-308.
- Darnell JJ. 1997. STATs and gene regulation. *Science*, 277 (5332):1630-1635.
- Darnell JJ. 1998. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res*, 18 (8):549-554.
- Dauer D, Ferraro B, Song L, Yu B, Mora L, Buettner R, Enkemann S, Jove R, Haura E. 2005. Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene*, 24 (21):3397-3408.
- Didieu S, Lefebvre P. 2006. Retinoids interfere with the AP1 signalling pathway in human breast cancer cells. *Cell Signal.* 18(6):889-98.
- Duncan S, Zhong Z, Wen Z, Darnell JJ. 1997. STAT signaling is active during early mammalian development. *Dev Dyn*, 208 (2):190-198.
- Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. 1996. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* 84(3): 443-450.
- Ehret GB, Reichenbach P, Schindler U, Horvath CM, Fritz S, Nabholz M, Bucher P. 2001. DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites. *J Biol Chem.* 276(9):6675-88.
- Eichhorst ST, Müller M, Li-Weber M, Schulze-Bergkamen H, Angel P, Krammer PH. 2000. A novel AP-1 element in the CD95 ligand promoter is required for induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells upon treatment with anticancer drugs. *Mol Cell Biol.* 20(20):7826-37.
- Emaduddin M, Bicknell DC, Bodmer WF, Feller SM. 2008. Cell growth, global phosphotyrosine elevation, and c-Met phosphorylation through Src family kinases in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*.105(7):2358-62. Epub 2008 Feb 7.
- Fugimori T, Fujii S, Saito N, Sugihara K 2009. Pathological diagnosis of early colorectal carcinoma and its clinical implications. *Digestion*, 79Suppl 1:40-51.

- Fukada T, Hibi M, Yamanaka Y, Takahashi-Tezuka M, Fujitani Y, Yamaguchi T, Nakajima K, Hirano T. 1996. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti apoptosis. *Immunity*, 5 (5):449-460.
- Gadina M, Hilton D, Johnston JA, Morinobu A, Lighvani A, Zhou YJ, Visconti R, O'Shea JJ. 2001. Signaling by type I and II cytokine receptors: ten years after. *Curr Opin Immunol*, 13 (3):363-373.
- Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. 2001. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 20(20): 2499-2513.
- Ginsberg M, Czeko E, Müller P, Ren Z, Chen X, Darnell JE Jr.. 2007. Amino acid residues required for physical and cooperative transcriptional interaction of STAT3 and AP-1 proteins c-Jun and c-Fos. *Mol Cell Biol*. 27(18):6300-8.
- Goyette M, Cho K, Fasching C, Levy D, Kinzler K, Paraskeva C, Vogelstein B, Stanbridge E. 1992. Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Mol Cell Biol*, 12 (3):1387-1395.
- Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR, et al. 1995. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *Embo J*, 14 (7):1421-1429.
- Hayasaka, A., Suzuki, N., Fujimoto, N., Iwama, S., Fukuyama, E., Kanda, Y., Saisho, H. (1996). Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 24(5): 1058-62.
- Heinrich P, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 334 (Pt 2):297-314.
- Heim M, Kerr I, Stark G, Darnell J. 1995. Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signalling by the Jak-STAT pathway. *Science* 267(5202):1347-9.
- Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*. 117(Pt 25):5965-73.
- Herold G und Mitarbeiter, Ausgabe 2010. Innere Medizin. Köln: Gerd Herold.
- Hoey T, Schindler U. 1998. STAT structure and function in signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8 (5):582-587.
- Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. 2000. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J. Invest. Dermatol*. 115, 337-344.
- Horvath CM, Wen Z, Darnell JE Jr.. 1995, A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev* 9(8), 984-994.
- Huang S, Bucana C, Van Arsdall M, Fidler IJ. 2002. Stat1 negatively regulates angiogenesis, tumorigenicity and metastasis of tumor cells. *Oncogene*. 21, 2504 ± 2512.
- Ihle JN. 2001. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 13(2):211-217.

- Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. 1997. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor beta1 release. *Biochem J.* 322 (Pt 3): 809-14.
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, Opavsky A, Cheng M, Welstead G, Griffiths E, Krawczyk C, Richardson CD, Aitken K, Iscove N, Koretzky G, Johnson P, Liu P, Rothstein DM, Penninger JM. 2001. CD45 is a JAK Phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, 409 (6818):349-354.
- Itoh M, Murata T, Suzuki T, Shindoh M, Nakajima K, Imai K, Yoshida K. 2006. Requirement of STAT3 activation for maximal collagenase-1 (MMP-1) induction by epidermal growth factor and malignant characteristics in T24 bladder cancer cells. *Oncogene*. 1195–1204.
- Jain N, Zhang T, Fong SL, Lim CP, Cao X. 1998. Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Oncogene*, 17 (24):3157-3167.
- Johansson N, Saarialho-Kere U, Airola K, Herva R, Nissinen L, Westermarck J, Vuorio E, Heino J, Kahari VM. 1997. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed by hypertrophic chondrocytes, periosteal cells, and osteoblasts during human fetal bone development. *Dev Dyn*. 208(3): 387-97.
- Kahari VM, Saarialho-Kere U. 1997. Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*. 6(5): 199-213.
- Karow T, Lang R, Ausgabe 2008. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Köln: Thomas Karow
- Kaplan MH, Schindler U, Smiley ST, Grusby MJ. 1996. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*. 4(3):313-309.
- Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285(1-2): 1-24.
- Korzus E, Nagase H, Rydell R, Travis J. 1997. The mitogen-activated protein kinase and JAK-STAT signalling pathways are required for an oncostatin M- responsive element-mediated activation of matrix metalloproteinase 1 gene expression. *J Biol Chem*. 272(2):1188-96.
- Köhne C HA. 2001. Aktuelle Therapie des kolorektalen Karzinoms. UNI-MED Verlag:16-17.
- Kovacic B, Stoiber D, Moriggl R, Weisz E, Ott RG, Kreibich R, Levy DE, Beug H, Freissmuth M, Sexl V. 2006. STAT1 acts as a tumor promoter for leukemia development. *Cancer Cell*. 10(1):77-87.
- Krämer OH, Knauer SK, Greiner G, Jandt E, Reichardt S, Gührs KH, Stauber RH, Böhmer FD, Heinzel T. 2009. A phosphorylation-acetylation switch regulates STAT1 signaling. *Genes Dev*. 23(2):223-35.
- Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Inoue K, Nagayasu T, Sekine I. 2006. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep*. 15(6):1445-51.
- Leaman DW, Leung S, Li X, Stark GR. 1996. Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *FASEB J*. 10(14): 1578-88.
- Lee W, Mitchell P, Tjian R. 1987. Purified transcription Factor AP-1 interacts with TPA- inducible enhancer elements. *Cell*. 49(6):741-52.

- Lerner L, Hendriksen MA, Zhang X, Darnell DE Jr.. 2003. STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene. *Genes Dev.* 17(20):2564-77.
- Levy D, Lee C. 2002. What does Stat3 do? *J Clin Invest*, 109 (9):1143-1148.
- Liotta LA, Stracke ML, Aznavoorian SA, Beckner ME, Schiffmann E. 1991. Tumor cell motility. *Semin Cancer Biol.* 2(2): 111-4.
- Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. 1997. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev.* 11(2): 179-186.
- Leitlinien zur Diagnostik und Therapie kolorektaler Karzinome. 2006. Tumor Zentrum Berlin.
- Lutticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemiecki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T. 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science.* 263(5143): 89-92.
- Marchenko GN, Marchenko ND, Strongin AY. 2003. The structure and regulation of the human and mouse matrix metalloproteinase-21 gene and protein. *Biochem J.* 372: 503-15.
- Matrisian LM, Hogan BL. 1990. Growth factor-regulated proteases and extracellular matrix remodelling during mammalian development. *Curr Top Dev Biol.* 24: 219-59.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD. 1996. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*, 84 (3):431-442.
- Moriggl R, Sexl V, Kenner L, Duntsch C, Stangl K, Gingras S, Hoffmeyer A, Bauer A, Piekorz R, Wang D, Bunting KD, Wagner EF, Sonneck K, Valent P, Ihle JN, Beug H. 2005. Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis. *Cancer Cell.* 7(1): 87-99.
- Möslein G. 2008. Hereditary colorectal cancer. *Chirurg.* 79(11):1038-46.
- Musti AM, Treier M, Bohmann D. Reduced ubiquitin- dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. 1997. *Science.* 275(5298):400-2.
- Narayan S, Roy D. 2003. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer*, 2:41.
- Nicola NA. 1994. Guidebook to cytokines and their receptors. 1e Aufl. Oxford: Oxford University Press.
- Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Kahari VM, Pyrhonen S. 2002. High expression levels of collagenase-1 and stromelysin-1 correlate with shorter disease-free survival in human metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 97(4): 432-8.
- Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu- Lehtinen P, Kähäri VM, Pyrhönen S. 2005. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 11, 5158-5166.

- O'Shea JJ, Gadina M, Schreiber RD. 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl:S121-131.
- Pardo A, Selman M. 2005. MMP-1: the elder of the family. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(2):283-8.
- Qing Y, Stark GR. 2004. Alternative activation of STAT1 and STAT3 in response to interferon-gamma. *J Biol Chem.* 279(40):41679-85.
- Ramirez-Carrozzi V, Kerppola T. 2003. Assymmetric recognition of nonconsensus AP-1 sites by jun-fos and jun-jun influences transcriptional cooperativity with NFAT1. *Mol Cell Biol.* 23, 1737-1749.
- Robert Koch Institut GdeKiDeV. 2008. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends., 6. überarbeitete Auflage.
- Robbins DH, Itzkowitz SH. 2002. The molecular and genetic basic of colon cancer, *Med Clin North Am*, 86(6):1467-95.
- Rustgi A. 2007. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*, 21(20):2525-38.
- Rutter JL, Mitchell TI, Buttice G, Meyers J, Gusella JF, Ozelius LJ, Brinckerhoff CE. 1998. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promoter creates an Ets binding site and augments transcription. *Cancer Res* 58(23), 5321-5325.
- Sano S, Takahama Y, Sugawara T, Kosaka H, Itami S, Yoshikawa K, Miyazaki J, van Ewijk W, Takeda J. 2001. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity.* 15(2): 261-73.
- Sato H, Kita M, Seiki M. 1993. V-src activates the expression of 92-kDa type IV collagenase gene through the AP-1 site and the GT box homologous to the retinoblastoma control elements. A mechanism regulating gene expression independent of that by inflammatory cytokines. *J Biol Chem.* 268, 23460- 23468.
- Schaefer TS, Sanders LK, Nathans D. 1995. Cooperative transcriptional activity of Jun and Stat3 beta, a short form of Stat3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(20):9097-101.
- Schiel R, Müller UA, Braun A, Stein G, Kath R. 2005. Risk of malignancies in patients with insulin-treated diabetes mellitus: results of a population-based trial with 10-year follow-up (Jevin), *EUR J Med Res*, 10(8):339-44.
- Schindler CW. 2002. Series introduction. JAK-STAT signaling in human disease. *J Clin Invest.* 109(9):1133-1137.
- Schirunga JJ, Timmer H, Luttickhuizen D, Vellenga E, Kruijer W. 2001. C-jun and c-fos cooperate with STAT3 in IL-6-induced transactivation of the IL-6-response element (IRE). *Cytokine.* 14, 78-87.
- Shaulian E, Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol.* 4(5):E131-6.
- Stanbridge E. 1990. Identifying tumor suppressor genes in human colorectal cancer. *Science*, 247 (4938):12-13.
- Suzuki T, Murakami M, Onai N, Fukuda E, Hashimoto Y, Sonobe MH, Kameda T, Ichinose M, Miki K, Iba H. 1994. Analysis of AP-1 function in cellular transformation pathways. *J Virol.* 68(6):3527-35.

- Swaroop A, Xu JZ, Pawar H, Jackson A, Skolnick C, Agarwal N. 1992. A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89(1):266-70.
- Takino T, Saeki H, Miyamori H, Kudo T, Sato H. 2007. Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase at cell-matrix adhesions. *Cancer Res*. 67(24):11621-9.
- ten Hoeve J, de Jesus Ibarra-Sanchez M, Fu Y, Zhu W, Tremblay M, David M, Shuai K. 2002. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol*, 22 (16):5662-5668.
- Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson D, Carbone D, Paul W, Berzofsky J. 2000. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol*, 1 (6):515-520.
- Thomas M, Finnegan CE, Rogers KM, Purcell JW, Trimble A, Johnston PG, Boland MP. 2004. STAT1: a modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*. 64(22): 8357-8364.
- Tsareva SA, Moriggl R, Corvinus FM, Wiederanders B, Schütz A, Kovacic B, Friedrich K. 2007. Signal transducer and activator of transcription 3 activation promotes invasive growth of colon carcinomas through matrix metalloproteinase induction. *Neoplasia*. 9(4):279-91.
- Wagner EF. 2001. AP-1- Introductory remarks. *Oncogene*. 20(19):2334-5.
- Ward AC, Touw I, Yoshimura A. 2000. The Jak-STAT pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood*. 95(1):19-29.
- Watson SA, Morris TM, Parsons SL, Steele RJ, Brown PD. 1996. Therapeutic effect of the matrix metalloproteinase inhibitor, batimastat, in a human colorectal cancer ascites model. *Br J Cancer*. 74(9):1354-8.
- Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. 1995. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82 (2):241-250.
- Westermarck J, Kähäri VM. 1999. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J*. 13, 781–792.
- Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. 1996. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem*. 271(17): 10079-86.
- Wood KV, de Wet JR. 1984. Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Commun* 124(2): 592-6.
- Van Dam H, Castellazzi M. 2001. Distinct roles of Jun:Fos and Jun:ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene*. 20(19):2453-64.
- Van Straaten F, Müller R, Curran T, van Beveren C, Verma IM. 1983. Complete nucleotide sequence of a human c-onc gene: deduced amino acid sequence of the human c-fos protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80(11):3183-7.
- Vinkemeier U, Cohen SL, Moarefi I, Chait BT, Kuriyan J, Darnell JE Jr.. 1996. DNA binding of in vitro activated Stat1 alpha, Stat1 beta and truncated Stat1: interaction between NH2-terminal domains stabilizes binding of two dimers to tandem DNA sites. *EMBO J*. 15(20): 5616-5626.

- Vogelstein B, Fearon E, Hamilton S, Kern S, Preisinger A, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits A, Bos J. 1988. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319 (9):525-532
- Vogt PK. 2001. Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 20:2365–2377.
- Yamamoto T, Matsuda T, Junicho A, Kishi H, Saatcioglu F, Muraguchi A. 2000. Cross-talk between signal transducer and activator of transcription 3 and estrogen receptor signaling. *FEBS Lett*, 486 (2):143-148.
- Yamashita S, Miyagi C, Carmany-Rampey A, Shimizu T, Fujii R, Schier AF, Hirano T. 2002. Stat3 Controls Cell Movements during Zebrafish Gastrulation. *Dev Cell*, 2 (3):363-375.
- Yang J, Liao X, Agarwal MK, Barnes L, Auron PE, Stark GR. 2007. Unphosphorylated STAT3 accumulates in response to IL-6 and activates transcription by binding to NFkappaB. *Genes Dev*. 21, 11396-11408.
- Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. 2000. Negative regulation of cytokine signaling pathways. *Annu Rev Immunol*, 18:143-164.
- Yu H, Jove R. 2004. The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* 4:97–105.
- Zhang X, Wrzeszczynska MH, Horvath CM, Darnell JE Jr.. 1999. Interacting regions in Stat3 and c-Jun that participate in cooperative transcriptional activation. *Mol Cell Biol*. 19(10):7138-46.
- Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr.. 1994. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 264(5155): 95-8.
- Zugowski C, Lieder F, Müller A, Gasch J, Corvinus F, Moriggl R, Friedrich KH. 2011. STAT3 controls matrix metalloproteinase-1 expression in colon carcinoma cells by both direct and AP-1-mediated interaction with the MMP-1 promoter. *Biol Chem*. 392(5):449-59.

7.5 Lebenslauf

Name:	Gasch	
Vorname:	Josephine	
Geburtsdatum:	29.12.1987	
Geburtsort:	Suhl	
Nationalität:	Deutsch	
Schullaufbahn:	Juni 2006	Abitur Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Suhl
Praktika:	2003	Praktikum im Klinikum am Lerchenberg in Zella-Mehlis
	2005	Praktikum in der Pathologie in Suhl
	2005	Praktikum in ambulanter chirurgischer Praxis in Zella-Mehlis
	2006	Pflegepraktikum im SRH Suhl
	2007	Pflegepraktikum im UKJ/Strahlentherapie
	09/2010	Famulatur auf kardiologischer Station und im Notdienst im Martin-Luther-Krankenhaus, Schleswig (Schleswig-Holstein)
	03/2011	Famulatur in Anästhesie/Intensivmedizin in Ilm-Kreis-Kliniken (Ilmenau)
	09/2011	Famulatur in internistischen Ambulanzen im Helios-Klinikum, Erfurt
Studium:	seit WS06/07	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller- Universität Jena
	09/2008	erste ärztliche Vorprüfung
	WS07/08- WS08/09	Tutorenstelle in der Anatomie für Repetitorien
	März 2009	Betreuung der biochemischen Praktika für Mediziner
	seit 09/2008	medizinische Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Signaltransduktion bei Prof.Dr.Friedrich
	seit 04/2010	studentische Hilfskraft im UKJ

Liste der Veröffentlichungen sowie der Beiträge zu Postern und Abstracts:

1. STAT3 controls matrix metalloproteinase-1 expression in colon carcinoma cells by both direct and AP-1-mediated interaction with the MMP-1 promoter

Constance Zugowski, Franziska Lieder, Annekatriin Müller, Josephine Gasch, Florian

M. Corvinus, Richard Moriggl, Karlheinz Friedrich

Biological Chemistry, 2011 May, 392(5):449-5

2. Complex expression control of MMP-1 in colorectal carcinoma by joint activities of transcription factors STAT3 and AP-1 (Poster)

Josephine Gasch, Annekatriin Müller, Constance Zugowski, Franziska Lieder, Kai Albring, Karlheinz Friedrich

Meeting der Signal Transduction Society 2010

3. Complex expression control of MMP-1 in colorectal carcinoma by joint activities of transcription factors STAT3 and AP-1 (Vortrag)

Josephine Gasch, Annekatriin Müller, Constance Zugowski, Franziska Lieder, Svetlana

A. Tsareva, Richard Moriggl, Karlheinz Friedrich

Postgraduate-Symposium on Cancer Research Dornburger Schlösser 2010

4. Aberrantly activated transcription factors STAT3 and AP-1 jointly control the expression of metalloproteinase MMP-1 in invasive solid cancers (Vortrag)

Josephine Gasch, Annekatriin Müller, Constance Zugowski, Franziska Lieder, Svetlana

A. Tsareva, Richard Moriggl, Karlheinz Friedrich

JAK-Stat signaling - from basics to disease Poster 10. bis 13 JAK- STAT- Meeting Vienna

Februar 2010

**5. Complex expression control of matrix metalloproteinase MMP-1 in colorectal carcinoma
by STAT3 and AP-1 (Poster)**

Josephine Gasch, Annekatrin Müller, Constance Zugowski, Franziska Lieder, Svetlana

A. Tsareva, Richard Moriggl, Karlheinz Friedrich

Meeting der Signal Transduction Society 2009

7.6 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Friedrich für die umfassende Betreuung meiner Arbeit bedanken. Er hatte stets Zeit für gemeinsame Überlegungen zu neuen Ideen und war immer behilflich während der Erstellung dieser Arbeit. Außerdem gab er mir die Möglichkeit, meine erarbeiteten Ergebnisse auf verschiedenen Symposien und Kongressen vorzustellen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich sowohl für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor als auch für die schöne Zeit außerhalb des Instituts. Die gemeinsamen Unternehmungen und Urlaube waren eine sehr schöne Erfahrung.

Dem IZKF danke ich für das einjährige Stipendium.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Kai Albring für die umfangreiche Hilfe bei der ChIP bedanken. Ohne ihn wären diese tollen Ergebnisse nicht möglich gewesen.

Torsten Ginter danke ich für die Beratung beim ABCD.

Und schließlich und von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie, Anne-Sophie Hajduk, Sabine Trenkmann, Maria Franczyk und Jens Bräutigam bedanken, die immer hinter mir gestanden und mich aufgefangen haben, wenn es nötig war. Danke dafür!

7.7 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Karlheinz Friedrich
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Josephine Gasch